

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA TOXINA-
ANTITOXINA REIBE2 DE *STREPTOCOCCUS*
*PNEUMONIAE***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Inmaculada Moreno Córdoba

Bajo la dirección de los doctores

Manuel Espinosa Padrón
Concha Nieto Mazarrón

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA
TOXINA-ANTITOXINA ReIBE2 DE
*Streptococcus pneumoniae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Inmaculada Moreno Córdoba

Bajo la dirección de los doctores:

Manuel Espinosa Padrón

Concha Nieto Mazarrón

Madrid, 2013

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Inmaculada Moreno Córdoba bajo la dirección del Dr. Manuel Espinosa Padrón y de la Dra. Concha Nieto Mazarrón, en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con financiación concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (Beca/Contrato FPI asociada al Proyecto BFU2007-63575), el Ministerio de Ciencia e Innovación / Ministerio de Economía y Competitividad (CSD2008-00013) y la Comisión Europea (EU-CP223111)

Opta al grado de Doctor

VºBº Directores de Tesis

Inmaculada Moreno Córdoba

Manuel Espinosa Padrón

Concha Nieto Mazarrón

A mis padres

*La ignorancia afirma o niega rotundamente;
la ciencia duda.*

VOLTAIRE

*La utopía está en el horizonte.
Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.
Camino diez pasos y el horizonte
se corre diez pasos más allá.
Entonces, ¿para qué sirve la utopía?
Para eso sirve: para caminar.*

EDUARDO GALEANO

Agradecimientos

Manolo, gracias por darme la oportunidad de descubrir el mundo de la ciencia. Gracias por permitirme aprender, crecer y trabajar con ilusión. Gracias por tus sabios consejos y por ser un gran maestro.

Concha, gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia, por hacerme disfrutar de este trabajo, por enseñarme tanto y por ser una gran maestra. Gracias por tu ayuda tanto profesinal como “extracurricular”.

Gracias a todos los integrantes del grupo. Gracias a Alicia, Gloria y a los “compañeros” Jose y Fabi por su constante ayuda y consejos. Gracias a Virtu, Sofi, Cris, Ana y Lore B. por estar siempre dispuestas a ayudarme, por los buenos momentos compartidos y por que “siempre nos quedará Berlín”. Gracias a Lore por todo su apoyo y trabajo. Gracias a Marta, Celeste, Tania y Wai Ting por su apoyo.

Gracias a Ramón Díaz Orejas y a los miembros de su laboratorio por su apoyo constante, especialmente agradezco a Ramón y a Elizabeth Diago Navarro su colaboración y aportación a este trabajo. Gracias a Miquel Coll y a todos los miembros de su grupo que han hecho posible la resolución de la estructura de RelBE2 Spn , Albert, Rosa, Diana y Robert. Gracias a Ernesto García y Miriam Moscoso por su paciencia para conseguir los *biofilms*. Gracias a Eva Medina por abrirme las puertas de su laboratorio en Braunschweig y permitirme vivir una interesante experiencia.

Gracias a mis padres por tenderme la mano en cada etapa de mi vida y ayudarme a levantar, por ser como sois, por salir del pensamiento único y por enseñarme a ser feliz. Fede, gracias por tu paciencia, comprensión y por darme siempre fuerzas para seguir adelante. Gracias a toda mi familia por su cariño. Gracias a Carmen por ser tía, hermana y amiga a la vez. Gracias a Almu, Diana y María por estar siempre ahí. Gracias a los “biólogos 2002” por hacerme pasar tan buenos momentos en la facultad y continuar haciéndolo. Gracias a Irene por su amistad incondicional.

Gracias a todos por los ánimos que siempre me dais y conseguir que no deje de sonreír.

ÍNDICE

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	7
1. DEFINICIÓN DE LOS SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA	9
2. TIPOS DE SISTEMAS TA	9
3. SISTEMAS TA DE TIPO II	12
3.1. LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II	12
3.2. FUNCIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II	14
3.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II	18
3.3.1. Regulación transcripcional	18
3.3.2. Cooperatividad condicional	18
3.3.3. Regulación traduccional	20
3.3.4. Regulación post-traduccional	20
3.4. FAMILIAS DE SISTEMAS TA DE TIPO II	20
3.5. CARACTERÍSTICAS Y HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL ENTRE SISTEMAS TA DE TIPO II CON ACTIVIDAD mRNA INTERFERASA	22
3.5.1. Estructura de antitoxinas	22
3.5.2. Estructura de toxinas: unión de la toxina a su sustrato	25
3.6. LA FAMILIA RelBE	27
3.6.1. RelBE	28
3.6.2. YefMYoeB	32
3.6.3. MqsRA	34
4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>: RELEVANCIA Y SISTEMAS TA	36
4.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
4.2. SISTEMAS TA EN <i>S. pneumoniae</i>	38
5. RELEVANCIA DE LOS SISTEMAS TA Y SU UTILIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y MEDICINA	43
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
MATERIALES	55

1. ESTIRPES BACTERIANAS	55
2. LÍNEAS CELULARES.....	55
3. MEDIOS DE CULTIVO	55
3.1. Cultivo de bacterias y selección.....	55
3.2. Medios de cultivo para líneas celulares	57
4. PLÁSMIDOS	57
5. OLIGONUCLEÓTIDOS	58
6. ENZIMAS, PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS	60
7. TAMPONES	60
8. SOPORTE INFORMÁTICO	63
MÉTODOS.....	64
1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS ...	64
2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	65
3. PREPARACIONES DE DNA.....	66
3.1. Extracción de DNA	66
3.2. Obtención de fragmentos de DNA	66
3.3. Purificación	67
3.4. Ligación de DNA.....	68
3.5. Construcción de plásmidos recombinantes	69
3.6. Construcción de mutantes cromosómicos por reemplazamiento génico.....	69
4. ANÁLISIS DE DNA	71
4.1. Cuantificación	71
4.2. Electroforesis	72
4.3. Secuenciación	73
4.4. Marcaje radiactivo de DNA	74
5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	74
5.1. Purificación de RelBE2 <i>Spn</i> y RelB2 <i>Spn</i>	74
5.2. Purificación de RelBE2 <i>Spn</i> con Selenio-Metionina	75
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	76
6.1. Cuantificación	76

6.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de PAA.....	76
6.3. Secuenciación del extremo N-terminal.....	76
6.4. Análisis de la composición de aminoácidos	76
6.5. Inmunodetección de proteínas	77
6.6. Ultracentrifugación analítica	78
6.7. Espectrometría de masas.....	79
6.8. Predicción de estructura secundaria de proteínas	80
6.9. Análisis de dicroísmo circular	80
7. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA	82
7.1. Ensayos de retardo en gel (EMSA)	82
7.2. Ensayos de <i>footprinting</i>	82
8. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X DEL COMPLEJO RelBE2Spn.....	83
9. ENSAYOS <i>in vivo</i>	84
9.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa	84
9.2. Crecimiento y análisis morfológico de <i>S. pneumoniae</i> en diferentes medios de cultivo	85
9.3 Cálculo de la frecuencia de transformación.....	86
9.4. Crecimiento en condiciones de <i>biofilm</i>	86
9.5. Ensayos de persistencia infectiva	87
RESULTADOS	91
CAPÍTULO 1: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO RelBE2Spn Y DE LA ANTITOXINA RelB2Spn	93
1.1. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO RelB2Spn- RelE2Spn(His)₆ Y DE LA ANTITOXINA (His)₆RelB2Spn EN <i>E. coli</i>...	95
1.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO RelBE2Spn Y DE LA ANTITOXINA RelB2Spn.....	102
1.2.1. Determinación de la masa molecular de la antitoxina y de la toxina obtenidas a partir de preparaciones de las proteínas RelB2Spn- RelE2Spn(His) ₆ o de (His) ₆ RelB2Spn purificadas.....	102
1.2.2. Estructura secundaria del complejo RelBE2Spn y de la antitoxina RelB2Spn.....	105
1.2.3. Estados de asociación del complejo RelBE2Spn y de la antitoxina RelB2Spn.....	111

1.2.4. Determinación de la estructura tridimensional del complejo RelBE2 <i>Spn</i> por cristalografía de rayos X	117
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL COMPLEJO RelBE2<i>Spn</i> Y DE LA ANTITOXINA RelB2<i>Spn</i>.....	121
2.1. CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE LA ANTITOXINA RelB2 <i>Spn</i> Y DEL COMPLEJO RelBE2 <i>Spn</i> : ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.....	123
2.2. IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN AL DNA DE LA ANTITOXINA RelB2 <i>Spn</i> Y DEL COMPLEJO RelBE2 <i>Spn</i> : ANÁLISIS MEDIANTE FOOTPRINTING.....	125
2.2.1. <i>Footprinting</i> con DNasa I	126
2.2.2. <i>Footprinting</i> con radical hidroxilo	127
2.3. ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN Y ESTEQUIOMETRIA DE LOS COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS RelBE2 <i>Spn</i> -DNA Y RelB2 <i>Spn</i> - DNA.....	132
2.3.1. Estado de oligomerización del complejo RelBE2 <i>Spn</i> unido a DNA mediante ensayos de ultracentrifugación analítica.....	132
2.3.2. Estequiometria de los complejos nucleoproteicos RelBE2 <i>Spn</i> -DNA y RelB2 <i>Spn</i> -DNA.....	134
2.4. CARACTERIZACIÓN DE RelB2 <i>Spn</i> Y RelBE2 <i>Spn</i> COMO ELEMENTOS REGULADORES EN LA TRANSCRIPCIÓN DEL OPERÓN <i>relBE2Spn</i>	135
CAPÍTULO 3: PAPEL DE LOS SISTEMAS RelBE2<i>Spn</i> y YefMYoeB<i>Spn</i> EN LA BIOLOGÍA DEL PNEUMOCOCCO	139
3.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CROMOSÓMICOS POR REEMPLAZAMIENTO GÉNICO	141
3.2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES CROMOSÓMICOS.....	141
3.2.1. Crecimiento y análisis morfológico de las estirpes silvestres y mutantes en diferentes medio de cultivo	141
3.2.2. Transformabilidad de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y mutantes.....	147
3.2.3. Capacidad de formación de <i>biofilms</i> de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y mutantes.	148
3.2.4. Papel de los TAS RelBE2 <i>Spn</i> y YefMYoeB <i>Spn</i> de <i>S. pneumoniae</i> en persistencia infectiva	150
DISCUSIÓN	157
1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO RelBE2 <i>Spn</i> Y DE LA ANTITOXINA RelB2 <i>Spn</i>	159

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL COMPLEJO ReIB2<i>Spn</i> Y DE LA ANTITOXINA ReIB2<i>Spn</i>	166
2.1. Capacidades de unión a DNA y de autorepresión.....	166
2.2. Mecanismo de autorepresión y cooperatividad condicional:	
Caracterización del DNA diana	168
3. PAPEL DE LOS SISTEMAS ReIB2<i>Spn</i> y YefMYoeB<i>Spn</i> EN LA BIOLOGÍA DEL PNEUMOCOCO	174
CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFÍA	183
APÉNDICE: PUBLICACIONES	205

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los distintos tipos de sistemas TA..	11
Figura 2. Organización genética y regulación de los sistemas TA de tipo II.	13
Figura 3. Modelo de cooperatividad condicional.....	19
Figura 4. Representación de la unión de MazE a su DNA diana.	23
Figura 5. Representación de la unión de RelB a su DNA diana.	23
Figura 6. Estructura del complejo MazEF de <i>E. coli</i>	25
Figura 7. Estructura tridimensional de la toxina Kid.	26
Figura 8. Estructura tridimensional del ribosoma 70S de <i>T. thermophilus</i>	27
Figura 9. Similitud estructural de las toxinas de la familia RelE y de la ribonucleasa microbiana Sa.....	27
Figura 10. Mecanismo de corte del mRNA catalizado por la proteína RelE asociada al sitio A del ribosoma.....	30
Figura 11. Estructura tridimensional del complejo RelBE de <i>E. coli</i> , <i>M. jannaschii</i> y <i>P. horikoshii</i>	32
Figura 12. Estructura tridimensional del complejo YefMYoeB de <i>E. coli</i> y YefM de <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 13. Estructura tridimensional de MqsRA.....	36
Figura 14. Organización genética del operón <i>relBE2Spn</i>	39
Figura 15. Organización genética del operón <i>yefMyoeBSpn</i>	41
Figura 16. Organización genética del operón <i>pezAT</i> de <i>S. pneumoniae</i>	42
Figura 17. Estructura tridimensional del complejo PezAT de <i>S. pneumoniae</i> ...	43
Figura 18. Posibles vías de activación de los sistemas TA para actuar como dianas de antimicrobianos.	45
Figura 19. Esquema de la construcción de mutantes cromosómicos	71
Figura 20. Inducción de la síntesis de RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> (His)6 y (His)6RelB2 <i>Spn</i>	96
Figura 21. Ensayo de <i>western blot</i>	98
Figura 22. Patrón de migración electroforética de las proteínas RelB2 <i>Spn</i> y RelE2 <i>Spn</i> en geles de PAA al 16% en presencia de diferentes porcentajes de SDS.	100
Figura 23. Purificación del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2His6 <i>Spn</i>	101
Figura 24. Purificación de la antitoxina (His)6RelB2 <i>Spn</i>	101
Figura 25. Espectro de masas MALDI-TOF del complejo RelB2 <i>Spn</i> - RelE2His6 <i>Spn</i>	103
Figura 26. Espectro de masas MALDI-TOF de la antitoxina His6RelB2 <i>Spn</i> ...	103
Figura 27. Espectro de masas ESI Q-TOF del complejo RelB2 <i>Spn</i> - RelE2His6 <i>Spn</i>	104

Figura 28. Predicción de la distribución de estructuras secundarias sobre la secuencia de RelB2 <i>Spn</i> y RelE2 <i>Spn</i>	106
Figura 29. Espectro de DC de la antitoxina His6RelB2 <i>Spn</i>	107
Figura 30. Espectro de DC del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> (His)6	108
Figura 31. Estabilidad térmica del complejo RelBE2 <i>Spn</i> y de la antitoxina RelB2 <i>Spn</i>	110
Figura 32. Estados de oligomerización de la antitoxina (His)6RelB2 <i>Spn</i>	112
Figura 33. Perfil de espectrometría de masas nativa de la antitoxina	113
Figura 34. Estados de oligomerización del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> (His)6.	114
Figura 35. Perfil de espectrometría de masas nativa del complejo TA.....	115
Figura 36. Estructura tridimensional del complejo RelBE2 <i>Spn</i>	118
Figura 37. Estructura tridimensional de cada uno de los monómeros que forman parte del heterohexámero (RelB ₂ -RelE) ₂	119
Figura 38. Unión del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> His6 y de la antitoxina His6RelB2 <i>Spn</i> al DNA operador.	124
Figura 39. EMSA del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> His6 y His6RelB2 <i>Spn</i> con DNA marcado radiactivamente.....	125
Figura 40. Ensayos de footprinting con DNasa I del complejo RelBE2 <i>Spn</i> unido a DNA.....	128
Figura 41. Ensayos de footprinting con DNasa I de la antitoxina RelB2 <i>Spn</i> unida a DNA.....	129
Figura 42. Ensayos de footprinting con radical hidroxilo del complejo RelBE2 <i>Spn</i> unido a DNA.	130
Figura 43. Ensayos de footprinting con radical hidroxilo de la antitoxina RelB2 <i>Spn</i> unida a DNA.	131
Figura 44. Esquema de las protecciones observadas frente a DNasa I y radical hidroxilo	132
Figura 45. Ensayo de EMSA utilizando como DNA diana un fragmento de 30pb..	133
Figura 46. Ultracentrifugación analítica de los complejos DNA-RelBE2 <i>Spn</i> . .	135
Figura 47. Perfiles de espectrometría de masas nativa de la antitoxina y del complejo TA unidos a DNA.	136
Figura 48. Análisis de la regulación transcripcional del operón relBE2 <i>Spn</i> mediante medida de la actividad β-galactosidasa	137
Figura 49. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los experimentos de regulación transcripcional	138
Figura 50. Esquema de la construcción de mutantes cromosómicos	142
Figura 51. Curvas de crecimiento de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 y D39 silvestre y los mutantes	142

Figura 52. Visualización de los cultivos de <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y los mutantes por microscopía de contraste de fases.....	143
Figura 53. Imágenes de las colonias crecidas en placas de agar-sangre a 37°C de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y mutantes.....	144
Figura 54. Curvas de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y el doble mutante en condiciones de estrés ácido y frente a diferentes concentraciones de zinc.....	146
Figura 55. Formación de biofilms de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y mutantes.	149
Figura 56. Imágenes de CLSM de la viabilidad de las estirpes R61 silvestre y doble mutante creciendo en biofilm.	150
Figura 57. Infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (línea celular A549) con la estirpe silvestre y doble mutante de pneumococos.....	152
Figura 58. Infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (línea celular A549) con <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y doble mutante	153
Figura 59. Infección de células endoteliales humanas de la vena umbilical (línea celular Huvec) con pneumococos silvestre y doble mutante.....	155
Figura 60. Secuencias de Shine-Dalgarno alternativas para el gen <i>relE2Spn</i> en <i>E. coli</i>	160
Figura 61. Predicción de estructuras secundarias derivadas de la secuencia de diferentes antitoxinas	160
Figura 62. Estructura tridimensional del complejo RelBE2Spn.....	163
Figura 63. Similitud estructural de las toxinas RelE de <i>E. coli</i> , de <i>P. horikoshii</i> y de <i>S. pneumoniae</i>	164
Figura 64. Modelo propuesto para las interacciones de RelB2Spn y RelE2Spn.	166
Figura 65. Representación sobre un modelo de DNA de doble hélice de las protecciones observadas frente a DNasa I y a radical hidroxilo en la región operadora.....	169
Figura 66. Modelo de la interacción del complejo RelBE2Spn con su secuencia operadora en el DNA.	170
Figura 67. Modelo estructural del complejo RelBE2Spn-DNA	171
Figura 68. Modelo de cooperatividad condicional propuesto para el sistema RelBE de <i>E. coli</i>	173

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familias de sistemas TA.....	21
Tabla 2. Aplicaciones de los sistemas TA.....	48
Tabla 3. Estirpes bacterianas.	55
Tabla 4. Composición del medio mínimo enriquecido (MME).....	56
Tabla 5. Plásmidos.	57
Tabla 6. Oligonucleótidos.	58
Tabla 7. Tampones.....	61
Tabla 8. Programas informáticos.....	63
Tabla 9. Punto isoeléctrico (pI) de las proteínas RelB2 <i>Spn</i> y RelE2 <i>Spn</i>	99
Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de las diferentes moléculas de RelB2 <i>Spn</i> y RelE2 <i>Spn</i>	105
Tabla 11. Predicción del contenido en estructura secundaria (%) de RelB2 <i>Spn</i> y RelE2 <i>Spn</i>	106
Tabla 12. Contenido en estructura secundaria (%) de la antitoxina His ₆ RelB2 <i>Spn</i>	107
Tabla 13. Contenido en estructura secundaria (%) del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> (His) ₆	108
Tabla 14. Composición de aminoácidos del complejo RelB2 <i>Spn</i> -RelE2 <i>Spn</i> (His) ₆	116
Tabla 15. Frecuencias de transformación (%) de las estirpes <i>S. pneumoniae</i> R61 silvestre y mutantes.	147

ABREVIATURAS

Ap	ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BL	repetición invertida " <u>b</u> inding <u>l</u> eft"
BR	repetición invertida " <u>b</u> inding <u>r</u> ight"
BrEt	bromuro de etidio
BSA	seroalbúmina bovina
CLSM	microscopía láser confocal espectral
Cm	cloramfenicol
Da	dalton
DC	dicroísmo circular
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EMN	espectrometría de masas nativa
ES	equilibrio de sedimentación
FACS	separación de células activadas por fluorescencia
G-	Gram-negativa
G+	Gram-positiva
GFP	proteína fluorescente verde
Gn	gentamicina
HTH	hélice-giro-hélice
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
Km	kanamicina
m/z	masa/carga
MOI	multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
ONPG	o-nitrofenil- β -Dgalactopiranósido

PAA	poliacrilamida
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pn	penicilina
PSA	persulfato amónico
PVDF	polivinildenofluoruro
RHH	lazo-hélice-hélice
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
SDS	dodecil sulfato sódico
Se-Met	selenio-metionina
Sm	estreptomicina
TA	toxina-antitoxina
Tc	tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-diamina
Tm	temperatura de fusión
tRNA	RNA de transferencia
UA	ultracentrifugación analítica
UV	ultravioleta
VS	velocidad de sedimentación

SUMMARY

Type II (proteic) toxin-antitoxin (TA) loci are ubiquitous in bacteria and are composed by two genes that are organized in an operon. The genes encode a stable toxin and an unstable antitoxin. In general, the antitoxin gene precedes, and frequently overlaps, the toxin gene. Both proteins bind to each other, generating a harmless complex, which regulate their own synthesis. These type II TA systems (TAS) were initially discovered in plasmids, but subsequently were identified in the chromosome of different bacteria and archaea. The chromosomally encoded TAS seem to be involved in different cellular processes, such as response to stress, programmed cell death, persistence and biofilm formation.

This Thesis' work is focused on the chromosomal RelBE2 system of the pathogenic Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae*.

The objectives of this Thesis based on the available data were: 1) The structural characterization of the RelBE2*Spn* protein complex and of the RelB2*Spn* antitoxin, 2) The functional characterization of the RelBE2*Spn* protein complex and RelB2*Spn* antitoxin, and 3) The searching for the role of pneumococcal RelBE2*Spn* and YefMYoeB*Spn* systems in the bacteria lifestyle.

Concerning the structural characterization of the proteins, whereas the antitoxin protein alone, and the antitoxin-toxin proteins were readily purified, we could not get the purification of the toxin alone. Purified proteins samples were used to perform several biochemical and biophysical approaches. Firstly, circular dichroism experiments revealed features of the secondary structure of the RelB2*Spn* antitoxin and the RelBE2*Spn* complex, indicating that both proteins show a high average of secondary structure, although the antitoxin was partially unfolded. Secondly, analytical ultracentrifugation and native mass spectrometry

were used to study the oligomerization state and the stoichiometry of the RelB2*Spn* and RelBE2*Spn* complex. The antitoxin behaved as a dimer in solution, whereas, the RelBE2*Spn* complex resulted to be a heterohexamer formed by the association of two heterotrimers. Each heterotrimer includes one antitoxin dimer and one toxin monomer. Finally, the crystal structure of the RelBE2*Spn* complex was resolved. Heterotetrameric and heterohexameric species were detected in the RelBE2*Spn* crystal. In these two molecular species, the toxin displays topological similarity to others toxins of the family and to the RNases. The antitoxins in heterotetramers and heterohexamers species exhibit, in their N-terminal region, a ribbon-helix-helix DNA-binding motif (RHH), similar to other RelB antitoxins. However each RelB2*Spn* monomer in these oligomeric structures shows a different fold. The existence of two oligomeric structures, heterotetramers and heterohexamers, might be related to transcriptional repression or to conditional cooperativity.

In the crystal structure, the pneumococcal antitoxin RelB dimerized through a RHH motif, present in several transcriptional repressors, and it is involved in the binding of the protein to its DNA target. By means of band-shift and footprinting assays, we found that the RelB2*Spn* antitoxin as well as the RelBE2*Spn* complex were able to bind to a 26-bp DNA operator sequence which spans the -10 promoter sequence, the transcription- initiation site and two inversely-repeated sequences of 3 and 6 bp. Transcriptional regulation assays indicated that RelBE2*Spn* regulates the expression of the *relBE* operon, the RelB2*Spn* antitoxin acting as the repressor and the RelE2*Spn* toxin as the co-repressor. Analytical ultracentrifugation and native mass spectrometry were performed with the DNA target and the RelBE2*Spn* protein complex. These

techniques allowed us to determine that the two proteins bound to their DNA operator forms a heterohexamer. Considering the structural data, the hydroxyl radical protections and the hydrodynamic properties of the two proteins, a structural model is proposed to explain the interaction of the RelBE2*Spn* complex with its DNA operator. The RelBE2*Spn* heterohexamer makes contacts with the DNA-backbone within the *relBE* operator on the same side of the DNA helix covering two consecutive major and minor grooves. The heterohexamer could contact with the DNA through the RHH motifs of each antitoxin dimer.

The third part of this Thesis deals with the role of the pneumococcal TAS RelBE2*Spn* and YefMYoeB*Spn* in the bacteria lifestyle. To this end, mutant strains deleted in *relBE2Spn*, in *yefMyoeBSpn*, and in both operons were constructed. The wild type and the mutant strains were tested for a number of physiological (response to stress, morphology of the cells, growth, and phase variation) parameters, and no major differences were found between them. However, differences were found in two important processes of the pneumococcal lifestyle, namely biofilm formation, and competence for transformation with chromosomal DNAs. Our results indicate that both, *relBE2Spn* and *yefMyoeBSpn*, participate directly or indirectly in genetic transformation, whereas only *yefMyoeBSpn* participate in biofilm formation.

The main general conclusions derived from the work presented in this Thesis are:

- The antitoxin RelB2*Spn* has a relatively high occurrence of α -helices and it is partially folded. RelB2*Spn* shows a relatively high heat stability being less prone to thermal aggregation than the TA complex.

- The RelBE2*Spn* protein complex has a high average of secondary structure, exhibiting a relatively high content in α -helices.
- The RelB2*Spn* antitoxin behaves as a dimer in solution whereas the RelBE2*Spn* complex is a heterohexamer.
- The three-dimensional structure of the RelBE2*Spn* protein complex has been solved by X-ray crystallography. The crystals included the two species, heterotetramers and heterohexamers.
- The RelB2*Spn* antitoxin is the transcriptional regulator of the *relBESpn* operon. RelB2*Spn* interacts weakly with its DNA target in a dimeric form; however, RelB2*Spn* in complex with RelE2*Spn* binds more efficiently to its DNA operator sequence.
- The RelBE2*Spn* operator site consists of a 26 bp region that includes the -10 region of the promoter, the transcription initiation site, and two inverted repeats of 3 and 6 bp.
- The RelBE2*Spn* complex binds as a heterohexamer to the operator sequence. Each heterohexamer is composed of two heterotrimers, and the RelBE2*Spn* heterotrimer contains one RelB2*Spn* dimer and one molecule of RelE2*Spn*.
- The *relBE2Spn* and *yefMyoeBSpn* operons are not essential, at least under the conditions tested. Deletion of the operons does not affect cell viability, cell morphology or phase variation.

- The *RelBE2Spn* and *YefMYoeBSpn* proteins do not seem to play a role on growth regulation under acidic stress and high zinc concentration.
- The *relBE2Spn* and *yefMyoeBSpn* operons could participate in the induction of the competence state for genetic transformation but only the *YefMYoeBSpn* system participates in biofilm formation of *S. pneumoniae*.

Bibliografía

- Bøggild, A., Sofos, N., Andersen, K. R., Feddersen, A., Easter, A. D., Passmore, L. A. and Brodersen, D. E. (2012). The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* 20: 1641–1648.
- Chan, W. T., Moreno-Córdoba, I.; Yeo, C.C. and Espinosa, M. (2012). Toxin-antitoxin genes of the gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*: so few and yet so many. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(4): 773–791.
- Gerdes, K. (2000). Toxin-Antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* 182(3): 561-572.
- Gerdes, K., Christensen, K. S. and Lobner-Olsen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci *Nat Rev Microbiol* 3: 371-382.
- Inouye, M. (2006). The discovery of mRNA interferases: implication in bacterial physiology and application to biotechnology. *J Cell Physiol* 209(3): 670-676.
- Nieto, C., Pellicer, T., Balsa, D., Christensen, S. K., Gerdes, K. and Espinosa, M. (2006). The chromosomal *relBE2* toxin–antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* 59(4): 1280–1296.
- Nieto, C., Sadowy, E., de la Campa, A. G., Hryniewicz, W. and Espinosa, M. (2010). The *relBE2Spn* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae* : role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates. *PLoS ONE* 5 (6e11289).

Schuster, C. F. and Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett*_doi: 10.1111/1574-6968.12074.

Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Ann Rev Genetics* 45: 61-79.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos y en concreto las bacterias, son capaces de desarrollar estrategias que les permiten adaptarse y sobrevivir en condiciones adversas (como carencia de nutrientes, cambios en pH y en temperatura). Las bacterias reaccionan a estos cambios que se producen en su entorno mediante la regulación de su expresión génica, proceso fundamental que le permite a la célula responder de una forma rápida y eficaz. En este sentido, los sistemas toxina-antitoxina (sistemas TA), ampliamente extendidos entre procariotas, son elementos genéticos que responden a situaciones de estrés y podrían favorecer cambios metabólicos que la célula necesita para establecerse y proliferar en diferentes nichos biológicos.

En esta Introducción se tratará de dar una visión informativa general de los sistemas TA, aunque nos centraremos fundamentalmente en los sistemas TA de tipo II con actividad mRNA inteferasa y más concretamente en la familia RelBE en la que se ha enfocado fundamentalmente este trabajo de tesis.

1. DEFINICIÓN DE LOS SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA

Los sistemas TA son elementos modulares formados, generalmente, por dos genes adyacentes, que están agrupados formando un operón. Uno de los genes codifica una toxina y el otro su antídoto, la antitoxina. La toxina es siempre una proteína estable que interrumpe procesos celulares esenciales para la proliferación o viabilidad celular. La antitoxina por el contrario es una molécula de naturaleza inestable que inhibe la actividad de la toxina. La diferente estabilidad de los componentes del sistema es lo que permite su activación.

2. TIPOS DE SISTEMAS TA

La naturaleza de la antitoxina y las interacciones que se establecen entre los componentes del sistema se ha utilizado como criterio para clasificar los sistemas TA.

- **Sistemas tipo I:** el gen de la antitoxina codifica un pequeño RNA antisentido complementario al RNA mensajero (mRNA) de la toxina. La asociación de ambos RNAs conduce a la formación de un RNA de doble cadena que puede reprimir la traducción y/o desestabilizar el mRNA de la toxina (Figura 1A) (Gerdes y Wagner, 2007). La toxina suele ser una proteína hidrofóbica pequeña (25-60 aminoácidos) con un posible dominio transmembrana. Estas proteínas podrían actuar de forma similar a las holinas fágicas induciendo la formación de poros en las membranas celulares, interfiriendo con la síntesis de ATP. Por tanto, la replicación, la transcripción y la traducción estarían inhibidas, lo que conduciría a la muerte celular (Gerdes y Wagner, 2007; Fozo, *et al.*, 2008; Brantl, *et al.*,

2012). El primer sistema tipo I y mejor caracterizado hasta el momento es el sistema *hok-sok* del plásmido R1 de *Escherichia coli* (Gerdes, *et al.*, 1986a). Otro sistema descrito es el sistema Par del plásmido pAD1 de *Enterococcus faecalis*, que junto con *hok-sok* están implicados en el mantenimiento de plásmidos (Weaver, *et al.*, 1993). Además se han encontrado homólogos cromosómicos de ambos sistemas (Pedersen y Gerdes, 1999; Faridani, *et al.*, 2006; Weaver, *et al.*, 2009), aunque su función todavía es desconocida.

- **Sistemas tipo II:** el gen de la antitoxina codifica una proteína que se une a la toxina mediante interacciones proteína-proteína y neutraliza el efecto de ésta (Figura 1B). Este tipo de sistemas se explicará más detalladamente en el apartado 3.
- **Sistemas tipo III:** la antitoxina es un pequeño RNA que se une y neutraliza la acción de la toxina formando un complejo RNA-proteína (Fineran, *et al.*, 2009) (Figura 1C). El primer sistema tipo III descrito fue ToxIN, localizado en un plásmido de la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora* (Fineran, *et al.*, 2009). Análisis cristalográficos del complejo ToxIN indican que la inhibición de la actividad endoribonucleasa de ToxN requiere la formación de un complejo trimérico ToxIN donde tres monómeros de ToxI se unen a tres monómeros de ToxN; las múltiples interacciones RNA-proteína son las responsables de estabilizar el complejo (Blower, *et al.*, 2011a). ToxIN, implicado en resistencia a bacteriófagos (Blower, *et al.*, 2009), era hasta hace poco tiempo el único sistema de tipo III descrito. Sin embargo, recientemente se ha identificado un sistema adicional de tipo III denominado AblQ. AblQ se localiza en un plásmido de la bacteria *Lactococcus lactis* (Samson, *et al.*, 2013). Tanto la estructura tridimensional del complejo, como la actividad de la toxina son similares a ToxIN, además AblQ está implicado al igual que ToxIN en mecanismos de defensa frente a infección por fagos. Por otro lado, se han identificado mediante análisis bioinformático, posibles sistemas de tipo III tanto en plásmidos como en cromosomas de una gran variedad de bacterias (Blower, *et al.*, 2012). Esta amplia distribución sugiere, que estos sistemas pueden tener una actividad mucho más diversa que la que inicialmente se les había adjudicado, la de defensa frente a infecciones fágicas.
- **Sistemas tipo IV:** la antitoxina es una proteína, pero se ha diferenciado de los sistemas tipo II debido a que la antitoxina no interacciona directamente con la toxina para neutralizar su actividad, sino que antagoniza su efecto interaccionando con la misma diana celular (Figura 1D). El sistema que se ha clasificado recientemente como tipo IV es el

sistema YeeUYeeV de *E. coli* (también denominado CssACbtA) (Masuda, *et al.*, 2012). La toxina CbtA es la primera que se ha encontrado que afecta a la morfología celular y a la división inhibiendo la polimerización de las proteínas del citoesqueleto MreB y FtsZ (Tan, *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la antitoxina CssA se une a las proteínas MreB y FtsZ y aumenta *in vitro* la formación de sus filamentos (Masuda, *et al.*, 2012).

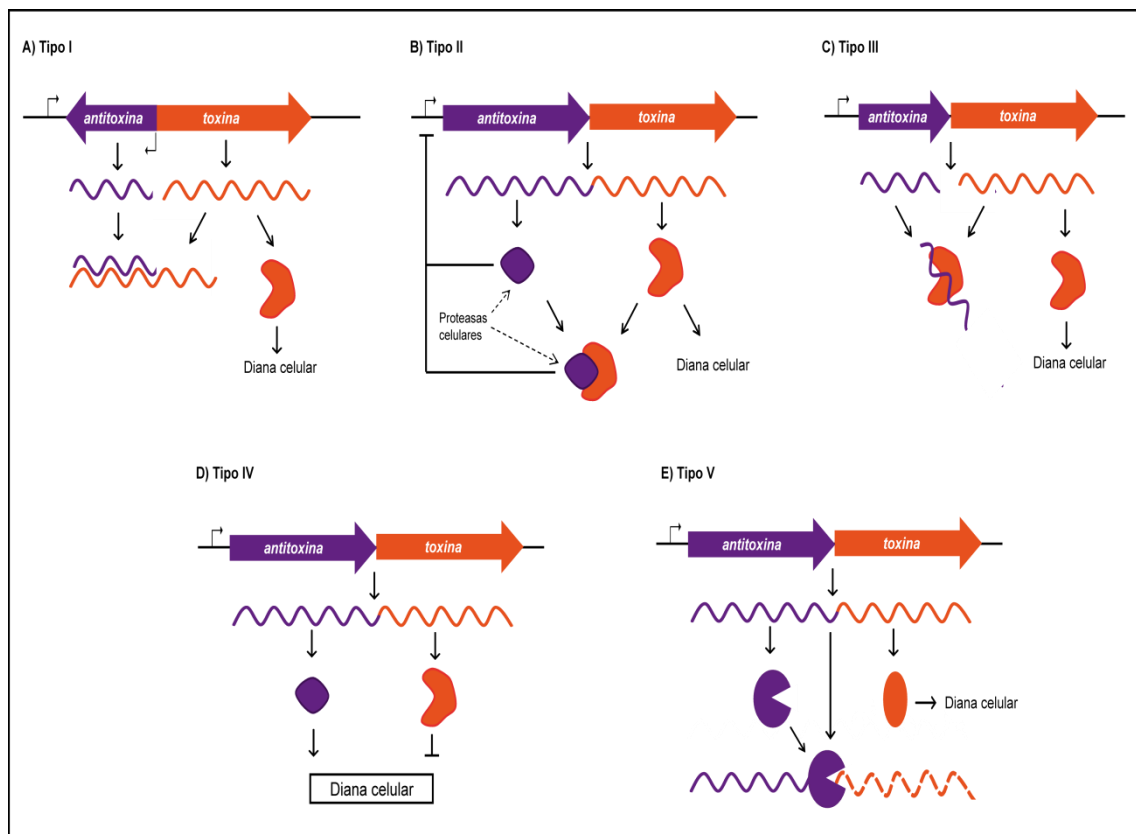


Figura 1. Representación esquemática de los distintos tipos de sistemas TA. Los genes, RNAs y proteínas en color morado corresponden a las antitoxinas y en color naranja a las toxinas. (A) Sistemas TA tipo I. Los genes de la antitoxina y la toxina se transcriben separadamente dando lugar a una toxina proteica y a una antitoxina que es un RNA antisentido que se une al mRNA de la toxina inhibiendo la traducción de ésta. (B) Sistemas TA tipo II. Los genes de la antitoxina y la toxina se transcriben como un único mRNA. La antitoxina es una proteína que se une a la toxina neutralizando su toxicidad. El complejo TA, y la antitoxina de manera más débil, autoregulan la expresión del sistema. En condiciones de estrés las antitoxinas son degradadas por proteasas celulares, dejando a la toxina libre que puede llevar a cabo su acción citotóxica. (C) Sistemas TA tipo III. La antitoxina es un pequeño RNA que se une y neutraliza la acción de la toxina. (D) Sistemas TA tipo IV. La antitoxina es una proteína que antagoniza el efecto de la toxina sobre su diana celular. (E) Sistemas TA tipo V. La antitoxina proteica degrada el mRNA de la toxina y por tanto impide su traducción. Modificado de (Yamaguchi, *et al.*, 2011; Masuda, *et al.*, 2012; Schuster y Bertram, 2013).

- En los **sistemas tipo V** la antitoxina proteica inhibe la actividad de la toxina degradando específicamente el mRNA de la toxina y por tanto

impidiendo su traducción (Wang, *et al.*, 2012) (Figura 1E). El sistema YjdKYjdO (renombrado recientemente como GhoSGhoT) pertenecería a este tipo de sistemas TA (Wang, *et al.*, 2012). Además, la antitoxina GhoS no funciona como el resto de las antitoxinas proteicas, ya que no es degradada proteolíticamente en condiciones de estrés y no se une a su región promotora para regular su transcripción (características típicas de los sistemas TA de tipo II que se describirán más adelante).

3. SISTEMAS TA DE TIPO II

El presente trabajo se centra en el estudio de sistemas TA de tipo II. En ellos y, en general, los genes de la toxina y antitoxina están organizados en un operón en el que el gen de la antitoxina suele preceder al gen de la toxina (Figura 2). Así, el primer gen codifica una antitoxina inestable y el segundo una toxina estable. Existen algunas excepciones a esta organización, como los sistemas HigBA (Tian, *et al.*, 1996), HicAB (Jørgensen, *et al.*, 2009), MqsRA (Brown, *et al.*, 2009) y BrnTA (Heaton, *et al.*, 2012), en los que el gen de la toxina precede al gen de la antitoxina. En todos los casos, ambas proteínas interaccionan para formar un complejo TA inocuo. Las antitoxinas tienen una doble función y dos dominios: uno implicado en la interacción proteína-proteína y el otro de unión a DNA. La unión de la antitoxina a la toxina, vía el dominio de interacción proteína-proteína, inhibe la actividad citotóxica de ésta y el complejo TA es capaz de unirse a su región operadora de una forma más eficiente que la antitoxina sola y actuar como represor transcripcional (Magnuson y Yarmolinksy, 1998; Gerdes, *et al.*, 2005; Monti, *et al.*, 2007; Overgaard, *et al.*, 2008).

3.1. LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II

Los sistemas TA fueron inicialmente identificados en plásmidos de bajo número de copias. Los primeros sistemas TA identificados fueron el sistema *ccd*, un sistema de tipo II localizado en el plásmido F de *E. coli* (Ogura y Hiraga, 1983), el sistema *parD* (*kis-kid*), sistema de tipo II incluido en el plásmido R1 de *E. coli* (Bravo, *et al.*, 1987) y el sistema *hok-sok*, sistema de tipo I codificado también por R1 (Gerdes, *et al.*, 1986a). Desde estos primeros estudios, se han identificado numerosos sistemas TA cromosómicos que comparten homología con los plasmídicos. Los sistemas TA son ubicuos y redundantes. Están ampliamente distribuidos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y en Archaea (Pandey y Gerdes, 2005; Sevin y Barloy-Hubler, 2007). Un análisis completo de un gran número de genomas bacterianos ha puesto de manifiesto la diversidad en la distribución de los sistemas TA: así, un mismo genoma puede presentar un alto número de loci TA, por ejemplo,

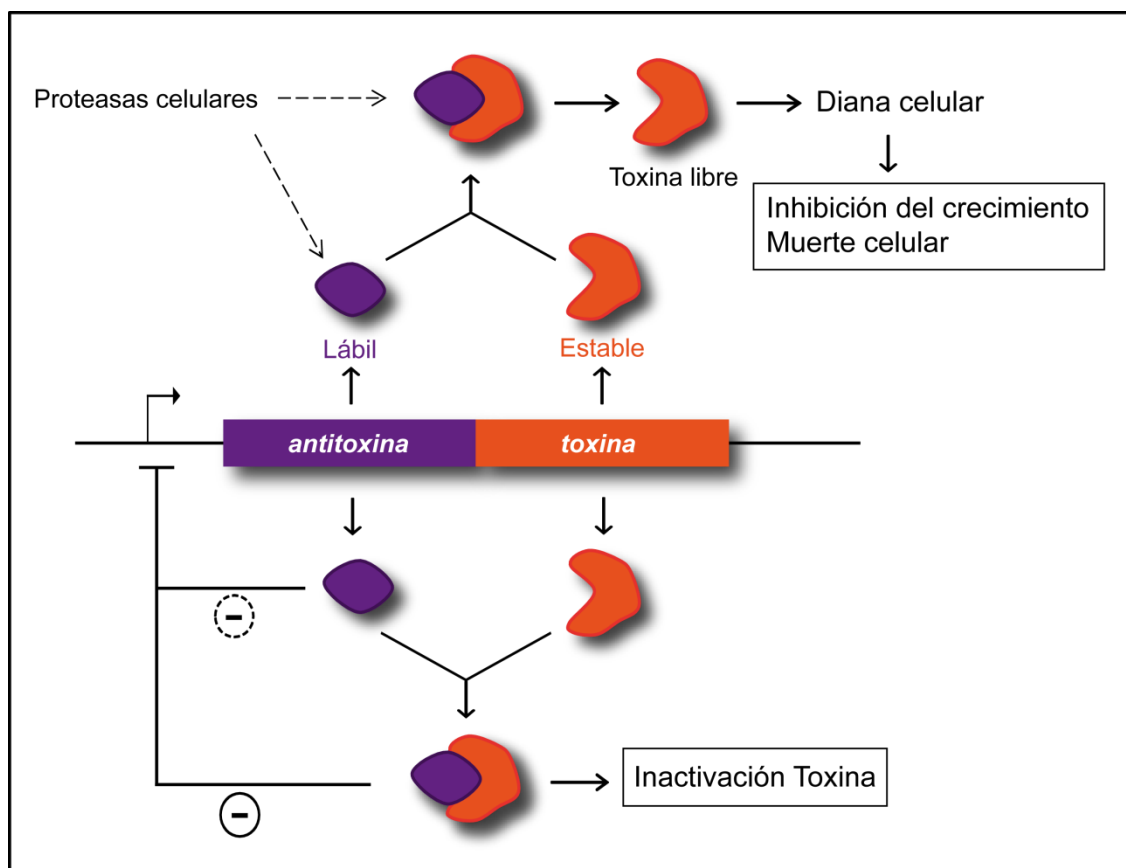


Figura 2. Organización genética y regulación de los sistemas TA de tipo II. Los genes de la antitoxina y la toxina están organizados en un operón en el que el gen de la antitoxina suele preceder al gen de la toxina. La antitoxina y la toxina interactúan formando un complejo que inhibe la actividad citotóxica de la toxina. El complejo TA se une a la región operadora del operón, de forma más eficiente que la antitoxina sola, y regula su propia síntesis. Las antitoxinas son susceptibles de ser degradadas por proteasas celulares, dejando a la toxina libre para actuar sobre su diana celular.

Nitrosomonas europaea y *Mycobacterium tuberculosis* contienen más de 50 sistemas TA (Makarova, *et al.*, 2009; Ramage, *et al.*, 2009; van Melder y Saavedra De Bast, 2009) mientras que en otros, su número es muy reducido (menos de tres) como en *Rickettsia prowazekii*, *Campylobacter jejuni*, o *Bacillus subtilis* o incluso podría carecer de ellos como en *Buchnera*, *Mycoplasma* y *Rickettsia belii* (Pandey y Gerdes, 2005; Makarova, *et al.*, 2009). Una búsqueda inicial de loci TA de tipo II en bacterias y archaeas realizada por Pandey y Gerdes (Pandey y Gerdes, 2005) sugería que la distribución y presencia de los sistemas TA estaba ligado a la forma de vida bacteriana: estarían muy representados en bacterias de vida libre, mientras que estarían ausentes en procariotas intracelulares. Según estos autores, las diferencias encontradas podían sugerir un papel de los sistemas TA en la adaptación eficiente a distintos nichos ecológicos o condiciones de crecimiento. Sin embargo, estudios posteriores de identificación de nuevos sistemas TA, mediante el análisis

comparativo de genomas bacterianos, han puesto de manifiesto que la relación entre tipo de vida bacteriana y la distribución de sistemas TA no parece ser correcta, ya que no existen datos suficientes que prueben que esta distribución diferencial no se deba meramente al azar (Sevin y Barloy-Hubler, 2007; Makarova, *et al.*, 2009).

3.2. FUNCIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II

Las funciones de los sistemas TA de tipo II podrían ser diferentes según sean de origen plasmídico o cromosómico. Los sistemas TA plasmídicos se descubrieron por su capacidad para asegurar el mantenimiento de un plásmido en poblaciones bacterianas en crecimiento mediante un mecanismo denominado muerte postsegregacional (del inglés “postsegregational killing, PSK”) (Jaffe, *et al.*, 1985; Gerdes, *et al.*, 1986b). La persistencia de los plásmidos en la población bacteriana es una consecuencia de la estabilidad diferencial de las toxinas y sus correspondientes antitoxinas (Tsuchimoto, *et al.*, 1992; Van Melderren, *et al.*, 1994). Así, en las células que pierden el plásmido, la antitoxina es degradada por las proteasas celulares y la toxina queda libre del complejo TA, lo que conduce al retraso en el crecimiento celular o incluso desencadena la muerte de las células libres de plásmido. Por ello a estos sistemas también se les denomina módulos de adicción (del inglés “addiction modules”), ya que las células se hacen “adictas” a estos sistemas TA para poder crecer o incluso sobrevivir (Yarmolinsky, 1995).

Por el contrario la función de los sistemas TA cromosómicos ha sido debatida durante años e incluso se ha propuesto que carecen de relevancia biológica (van Melderren, 2010). Sin embargo, en los últimos años se ha valorado la importancia de los sistemas TA adjudicándoles diversas funciones, como son las siguientes:

i) Respuesta a condiciones de estrés. Se han propuesto dos modelos para explicar el papel de los sistemas TA en situaciones de estrés:

- **Modelo de la muerte celular programada** (PCD, del inglés “programed cell death”), propuesto por Engelberg-Kulka, está basado en el sistema MazEF de *E. coli* (Engelberg-Kulka, *et al.*, 2005). Según este modelo, diversas condiciones de estrés (ayuno de aminoácidos, tratamiento antibiótico, alta temperatura, estrés oxidativo) inducirían la síntesis de un pequeño péptido denominado factor de muerte extracelular (EDF, del inglés “extracellular death factor”) (Kolodkin-Gal, *et al.*, 2007). Este péptido activaría la toxina MazF, la cual promovería la muerte “altruista” de una parte de la población bacteriana. Esta muerte proporcionaría nutrientes a las células supervivientes y

protegería el cromosoma bacteriano al evitar la expansión de infecciones por fagos (Engelberg-Kulka, *et al.*, 2004).

- **Modelo del crecimiento bacteriostático**, propuesto por el grupo de Gerdes, defiende que la activación de los sistemas TA induciría una dormancia metabólica reversible que le permite a la célula sobrevivir en condiciones desfavorables. Esta propuesta, que puede hacerse extensiva a un gran número de sistemas TA, deriva de los estudios realizados fundamentalmente con el sistema RelBE de *E. coli* (Christensen, *et al.*, 2001; Pedersen, Christensen *et al.*, 2002). Este modelo originariamente se basó en la observación de que el ayuno de aminoácidos activaba la transcripción de *relBE* a través de la degradación de RelB por la proteasa Lon. Como consecuencia, RelE inhibiría la traducción de proteínas e induciría un estado de “stasis” en la población bacteriana que resultaría en la aparición de células viables pero no cultivables. Las células se recuperarían de este estado de detención del crecimiento cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (Christensen, *et al.*, 2001). De acuerdo con este modelo, la actividad de RelE provocaría una reducción de la traducción durante el ayuno de aminoácidos que, a su vez, permitiría aumentar los niveles de tRNA cargados aumentando así la fidelidad de la traducción (Christensen, *et al.*, 2001; Pedersen, *et al.*, 2002; Sorensen, 2001). Por tanto, estos sistemas TA podrían actuar como reguladores de la tasa de traducción y replicación dependiendo del aporte de nutrientes desde el medio. De acuerdo a esta hipótesis, se ha observado la inducción de la transcripción de varios sistemas TA por *heat shock* en *Sulfolobus sulfataricus* (Tachdjian, *et al.*, 2006) y por exposición a cloroformo en *Nitrosomonas europaea* (Gvakharia, *et al.*, 2007).

ii) Contribución en persistencia y formación de *biofilms*. La persistencia bacteriana es un fenómeno que permite a la bacteria tolerar una gran variedad de antibióticos y situaciones adversas (Lewis, 2005). Las células persistentes, minoritarias en la población bacteriana, son células viables que no crecen o lo hacen muy lentamente, tolerando así las situaciones desfavorables del medio (Balaban, *et al.*, 2004; Balaban, 2011). Se ha sugerido que las células persistentes se generan fundamentalmente en situaciones de parada del crecimiento, como ayuno de aminoácidos, entrada en fase estacionaria y formación de *biofilms*. En este sentido, los sistemas TA, cuya activación promueve una parada reversible del crecimiento bacteriano, podrían ser candidatos para la generación de células persistentes. El primer sistema TA que se relacionó con persistencia fue el sistema HipBA, ya que la frecuencia de aparición de *E. coli* persistentes durante un tratamiento con ampicilina se incrementaba en un mutante de la toxina (*hipA7*) (Moyed y Bertrand, 1983;

Korch, *et al.*, 2003). Posteriormente, dos estudios transcriptómicos independientes mostraron que las células persistentes de *E. coli* contienen niveles elevados de mRNAs pertenecientes a sistemas TA (Keren, *et al.*, 2004; Shah, *et al.*, 2006). El estudio llevado a cabo por Keren y colaboradores identificó un 2% de genes sobreexpresados pertenecientes a sistemas TA: *dinJ/yafQ*, *yefM*, *relBE* y *mazEF* (Keren, *et al.*, 2004). El grupo de Lewis observó que, en células persistentes, los sistemas DinJ/YafQ y YefM/YoeB y el gen de la toxina MqsR (sistema MqsRA) estaban sobreexpresados, mientras que RelBE y MazEF no lo están (Shah, *et al.*, 2006). En este sentido, análisis genéticos indicaron que la delección de cada uno de los locus TA de *E. coli* no producía ningún efecto en la frecuencia de persistencia; sin embargo, la delección de los 10 sistemas TA presentes en la bacteria reducía la persistencia de una manera gradual a medida que se iban delecionando sistemas TA progresivamente (Maisonneuve, *et al.*, 2011). Además, la sobreexpresión de toxinas como RelE, MazF, MqsR y TisB (TisAB) induce la aparición de células persistentes (Dörr, *et al.*, 2010; Kim y Wood, 2010; Maisonneuve, *et al.*, 2011).

La posible relación de los sistemas TA con persistencia ha sugerido que también podrían relacionarse con la formación de *biofilms* (Ren, *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2011). Los *biofilms* se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Hall-Stoodley, *et al.*, 2009). Estas comunidades bacterianas se caracterizan porque su crecimiento es muy reducido y presentan tolerancia a una gran variedad de antibióticos (*multidrug tolerance*) (Hall-Stoodley, *et al.*, 2009). Se ha observado que el gen *mqsR* se induce en *biofilms* de *E. coli* (Ren, *et al.*, 2004). Además, la delección conjunta de cinco sistemas TA (MazEF, RelBE, YefMYoeB, DinJYafQ y ChpBIK) redujo la formación de *biofilms* durante las primeras 8 horas (Kim, *et al.*, 2009). Del mismo modo la delección del sistema HipBA redujo significativamente la formación de *biofilm* en *E. coli* (Zhao, *et al.*, 2013). Por otro lado, la delección del gen *yafQ* en *E. coli*, aunque no alteró las características del *biofilm*, comparado con la estirpe silvestre, sí redujo dramáticamente la viabilidad celular cuando el *biofilm* era expuesto a diferentes antibióticos con actividad bactericida (Harrison, *et al.*, 2009). Todos estos resultados indican que distintos sistemas TA pueden estar implicados en fenómenos de persistencia y colaborar en la formación y optimización de *biofilms* bacterianos.

iii) Protección frente a muerte postsegregacional. El grupo de van Melderén ha propuesto que, en algunos casos, los sistemas TA podrían ser considerados como módulos anti-adicción protegiendo a las bacterias portadoras contra mecanismos de muerte postsegregacional codificados en sistemas plasmídicos homólogos (van Melderén y Saavedra De Bast, 2009). Se ha observado que el sistema cromosómico Ccd_{Ech} de *Erwinia chrysanthemi* 3937 presenta esta

propiedad respecto a su sistema plasmídico homólogo CcdAB del plásmido F de *E. coli* (Saavedra De Bast, *et al.*, 2008).

iv) Estabilización de regiones cromosómicas. Algunos de los sistemas TA encontrados en cromosomas bacterianos están formando parte de profagos o elementos genéticos móviles como los superintegrones. Como se ha observado para los plásmidos, debido a las propiedades de adicción de los sistemas TA, éstos podrían impedir la pérdida de regiones cromosómicas (Rowe-Magnus, *et al.*, 2003; Szekeres, *et al.*, 2007). Se ha comprobado que al introducir en el cromosoma de *E. coli* dos sistemas TA del superintegrón de *Vibrio vulnificus*, se impedía la delección de DNA de las regiones adyacentes (Szekeres, *et al.*, 2007). *V. cholerae* contiene 13 sistemas TA y todos ellos se localizan en un superintegrón (Pandey y Gerdes, 2005). Entre estos, dos sistemas HigBA estabilizan plásmidos en *E. coli* de manera muy eficiente, lo que sugiere que estos sistemas podrían aumentar el mantenimiento de genes con los que están relacionados (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006).

v) Desarrollo celular, en particular en la formación de cuerpos fructíferos de *Myxococcus xanthus*, estructuras multicelulares que la bacteria forma en condiciones de falta de nutrientes (Nariya e Inouye, 2008). En *M. xanthus* se identificó un gen homólogo a la toxina MazF, pero ningún gen homólogo al de la antitoxina MazE. En el proceso de formación del cuerpo fructífero, el 80% de la población es sacrificada por un proceso de PCD, en el que parece jugar un papel importante la toxina MazF, ya que la delección del gen *mazF* provoca una reducción en la formación de myxoesporas. En este microorganismo, la expresión y la actividad de MazF están controladas por el regulador global de diferenciación MrpC. Así, cuando comienza la formación del cuerpo fructífero, MrpC induce no solo la expresión, sino también la actividad mRNA interferasa de MazF. MazF degradaría a una serie de mRNAs ligados a viabilidad y desarrollo disparando el proceso de muerte celular (Boynton, *et al.*, 2013).

vi) Protección frente a fagos. Ya que los bacteriófagos pueden interferir con la transcripción y traducción celular, podrían activar los sistemas TA. La activación de estos sistemas y de sus correspondientes toxinas limitaría de esta forma la propagación de los fagos. En concreto, se ha descrito que el sistema ToxIN presente en un plásmido de *E. carotovora* (sistema TA de tipo III) confiere resistencia a diferentes fagos (Blower, *et al.*, 2009), al igual que lo haría el sistema cromosómico MazEF de *E. coli* (Hazan, *et al.*, 2004).

3.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS SISTEMAS TA DE TIPO II

Los sistemas TA se inducen bajo condiciones desfavorables para el crecimiento celular. Su activación, en concreto la de la toxina, supone una interferencia en procesos biológicos esenciales (síntesis de proteínas, replicación de DNA) que conduce a una parada del crecimiento e incluso a la muerte celular. Bajo esta perspectiva, la expresión en los sistemas TA debe estar controlada de una forma eficiente y así, su regulación se ejerce a distintos niveles.

3.3.1. Regulación transcripcional

En los sistemas TA de tipo II la antitoxina se une a una región operadora que solapa con el promotor del operón reprimiendo su transcripción (Magnuson y Yarmolinsky, 1998; Gerdes, *et al.*, 2005; Monti, *et al.*, 2007; Overgaard, *et al.*, 2008). Aunque la antitoxina es capaz de unirse al sitio operador, su interacción con la toxina (que actúa como co-represor) permite al complejo TA unirse con mayor afinidad al DNA y reprimir su propia transcripción de una manera más eficiente que la antitoxina sola (Gottfredsen y Gerdes, 1998; Magnuson y Yarmolinsky, 1998; Marianovsky, Aizenman *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2003). No todos los sistemas TA siguen este patrón de regulación transcripcional; existen excepciones como el sistema $\omega\epsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (de la Hoz, *et al.*, 2000) y el sistema PaaR-PaaA-ParE del cromosoma de *E. coli* O157:H7 (Hallez, *et al.*, 2010). En el caso de $\omega\epsilon\zeta$ la antitoxina ϵ solamente actúa inhibiendo la actividad tóxica de la toxina ζ y la expresión de los genes de la antitoxina y la toxina está regulada por el regulador transcripcional ω (de la Hoz, *et al.*, 2000). En el caso del sistema PaaR-PaaA-ParE, el complejo TA PaaAParE reprime su transcripción parcialmente mientras que la proteína PaaR la reprime de manera más eficiente, pero son necesarios tanto el complejo TA como la proteína PaaR para asegurar una completa represión (Hallez, *et al.*, 2010).

3.3.2. Cooperatividad condicional

Para algunos sistemas TA se ha descrito un mecanismo adicional de regulación transcripcional al que se ha denominado de “cooperatividad condicional”. Este mecanismo se refiere a la capacidad que tiene la toxina de actuar como co-represor y des-represor dependiendo de la relación entre los niveles de antitoxina y toxina del sistema. Este mecanismo se caracterizó inicialmente en el sistema RelBE de *E. coli* (Figura 3). Así, cuando las bacterias crecen en condiciones de crecimiento favorables, los niveles de antitoxina RelB exceden los de toxina ($\text{RelB/RelE} \gg 1$), formándose diferentes complejos TA, heterotriméricos $(\text{RelB})_2\text{-RelE}$ y heterotetraméricos $(\text{RelB})_2(\text{RelE})_2$. De estos heterocomplejos sólo el trímero $(\text{RelB})_2\text{-RelE}$ se une de forma efectiva a su DNA diana (Overgaard, *et al.*, 2009). La unión de un trímero al DNA operador promueve la unión de un segundo trímero a un sitio adyacente del DNA,

formando un heterohexámero $\text{RelE}-(\text{RelB})_2-(\text{RelB})_2-\text{RelE}$ que bloquea la transcripción (Overgaard, *et al.*, 2009). Por el contrario, cuando las bacterias tienen que hacer frente a condiciones desfavorables, los niveles de antitoxina disminuyen ($\text{RelB}/\text{RelE} \ll 1$) debido a su degradación y a la reducción de la síntesis de proteínas. En estas condiciones aumentaría la proporción de moléculas libres de toxina RelE. Las moléculas libres de RelE se unirían a las antitoxinas RelB que forman parte del complejo heterotrimérico o heterohexamérico unido al DNA operador. La interacción de RelE con las antitoxinas provocaría en las proteínas RelB un cambio conformacional que promueve su liberación del DNA y permite la transcripción del operón (Figura 3) (Cataudella, *et al.*, 2012). El mecanismo de cooperatividad condicional se ha descrito también para los sistemas PhdDoc del bacteriófago P1 y VapBC de *Salmonella entérica*. El mecanismo de PhdDoc es similar al modelo de RelBE (García-Pino, *et al.*, 2010), mientras que el de VapBC difiere ya que el exceso de

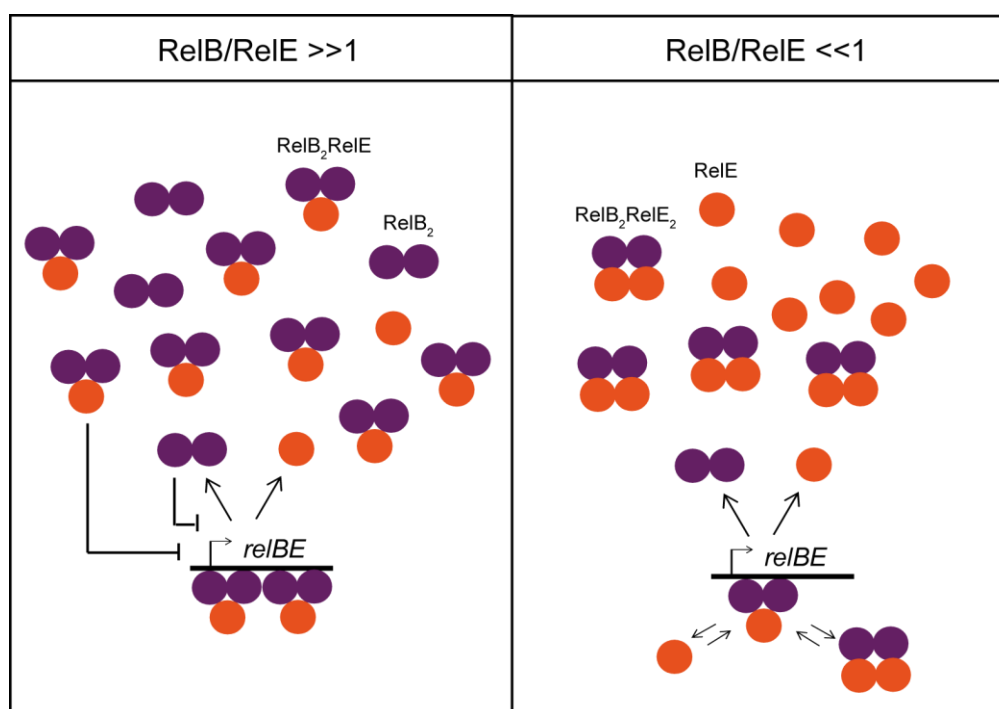


Figura 3. Modelo de cooperatividad condicional. RelB y RelE pueden interactuar para formar dos tipos de complejos, heterotrimeros $(\text{RelB})_2\text{-RelE}$ y heterotetrámeros $(\text{RelB})_2(\text{RelE})_2$, cuya proporción depende de la relación entre los niveles de RelB/RelE. En condiciones de crecimiento favorables, los niveles de RelB exceden los de RelE ($\text{RelB}/\text{RelE} \gg 1$), formándose complejos heterotriméricos que se unen de forma efectiva a su DNA diana y promueven la unión de un segundo trímero a un sitio adyacente del DNA, formando un heterohexámero que bloquea la transcripción. Cuando los niveles de antitoxina disminuyen ($\text{RelB}/\text{RelE} \ll 1$), las moléculas libres de RelE se unirían a las antitoxinas RelB que forman parte del complejo heterotrimérico o heterohexamérico unido al DNA operador, provocando un cambio conformacional que promueve su liberación del DNA y permite la transcripción del operón. (Adaptado de Cataudella, *et al.*, 2012).

la toxina VapC induce la transcripción desestabilizando el complejo octamérico [(VapBC)₂]₂ unido al operador por la ruptura del dímero de VapC (Winther y Gerdes, 2012). Además la cooperatividad condicional se ha sugerido para el sistema MazEF de *E. coli* (Kamphuis, *et al.*, 2007) y CcdAB del plásmido F de *E. coli* (De Jonge, *et al.*, 2009).

3.3.3. Regulación traduccional

Algunos sistemas TA presentan un acoplamiento traduccional, es decir, el codón de terminación de la antitoxina solapa con los primeros codones de la toxina (Bravo, *et al.*, 1987; Metzger, *et al.*, 1988; Black, *et al.*, 1991; Gerdes, 2000; Nieto, *et al.*, 2006). La existencia de un acoplamiento traduccional implica una traducción de la toxina dependiente de una traducción previa de la antitoxina. Así, en células creciendo de forma exponencial se ha valorado que solo 1/100 de los ribosomas que traducen *relB* continúan traduciendo *relE* (Cataudella, *et al.*, 2012). De esta forma se asegura una mayor producción de antitoxina ligada al proceso de traducción del operón.

3.3.4. Regulación post-traduccional

Los componentes de los sistemas TA se caracterizan por su diferente estabilidad. Las toxinas son proteínas estables. Por el contrario, en las antitoxinas el dominio C-terminal no presenta una estructura ordenada (Yamaguchi, *et al.*, 2011), siendo más susceptibles de degradación por proteasas celulares, como proteasas dependientes de ATP de tipo Lon y ClpP (Jaffe, *et al.*, 1985; Gerdes, *et al.*, 1986b; Tsuchimoto, *et al.*, 1992; Van Melderen, *et al.*, 1994; Lehnher y Yarmolinsky, 1995; Aizenman, *et al.*, 1996; Christensen, *et al.*, 2004). La degradación de la antitoxina permite la activación del sistema al aumentar la presencia de moléculas de toxina libre.

3.4. FAMILIAS DE SISTEMAS TA DE TIPO II

Los sistemas TA de tipo II se han clasificado en diez familias atendiendo a la homología de la secuencia de aminoácidos de sus toxinas. Se han identificado miembros de las distintas familias, tanto en cromosomas como en plásmidos. En la tabla 1 se detalla la actividad de las distintas toxinas y el proceso celular afectado.

Recientemente, mediante análisis bioinformático se han identificado más de 18 secuencias de antitoxina y 23 secuencias de toxinas de diferentes especies bacterianas (Leplae, *et al.*, 2011), por lo que los autores de este estudio proponen referirse a familias de antitoxinas y toxinas independientemente, en lugar de familias de sistemas TA.

Tabla 1. Familias de sistemas TA.

Familia TA (locus)	Antitoxina	Toxina	Actividad de la toxina	Diana de la toxina	Proceso celular afectado	Distribución
<i>ccdAB</i> ¹	CcdA	CcdB	Bloquea actividad de DNA girasa	DNA girasa	Replicación	Bacterias G-
<i>relBE</i> ²	RelB	RelE	Rotura de mRNA	mRNAs asociados al ribosoma	Traducción	Bacterias G-, G+ y Archaea
<i>parDE</i> ³	ParD	ParE	Bloquea actividad de DNA girasa	DNA girasa	Replicación	Bacterias G- y G+
<i>higBA</i> ⁴	HigA	HigB	Rotura de mRNA	mRNAs asociados al ribosoma	Traducción	Bacterias G- y G+
<i>mazEF</i> ⁵	MazE	MazF	Endoribonucleasa	mRNAs libres	Traducción	Bacterias G- y G+
<i>phd/doc</i> ⁶	Phd	Doc	Bloquea la translocación del ribosoma. Induce rotura del mRNA a través de activación RelE	Subunidad 30S del ribosoma	Traducción	Bacterias G-, G+ y Archaea
<i>vapBC</i> ⁷	VapB	VapC	Corte de tRNA ^{Met}	tRNA ^{Met}	Traducción	Bacterias G-, G+ y Archaea
<i>ωεζ</i> ⁸	ε	ζ	Actividad fosfotransferasa	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UNAG)	Síntesis de peptidoglicano	Bacterias G+
<i>hipAB</i> ⁹	HipB	HipA	Actividad quinasa, fosforila el factor de traducción EF-Tu e inhibe la traducción	Factor de traducción EF-Tu	Traducción	Bacterias G- y G+
<i>hicAB</i> ¹⁰	HicB	HicA	Rotura de mRNA	mRNAs libres	Traducción	Bacterias G-, G+ y Archaea

¹(Ogura y Hiraga, 1983); (van Melderén y Saavedra De Bast, 2009). ²(Gerdes, 2000). ³(Gerlitz, *et al.*, 1990); (Sobecky, *et al.*, 1996). ⁴(Tian, *et al.*, 1996); (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006). ⁵(Metzger, *et al.*, 1988); (Masuda, *et al.*, 1993). ⁶(Lehnher, *et al.*, 1993); (García-Pino, *et al.*, 2008); (Liu, *et al.*, 2008). ⁷(Pullinger y Lax, 1992); (Daines, *et al.*, 2007). ⁸(Meinhart, *et al.*, 2003); (Mutschler y Meinhart, 2011). ⁹(Korch y Hill, 2006); (Correia, *et al.*, 2006); (Schumacher, *et al.*, 2009). ¹⁰(Jørgensen, *et al.*, 2009); (Makarova, *et al.*, 2006). Modificado de (Gerdes, *et al.*, 2005 y van Melderén, 2010).

3.5. CARACTERÍSTICAS Y HOMOLOGIA ESTRUCTURAL ENTRE SISTEMAS TA DE TIPO II CON ACTIVIDAD mRNA INTERFERASA

Las mRNA interferasas son endoribonucleasas que cortan el mRNA en secuencias específicas, inhibiendo su traducción tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta actividad RNasa puede ser dependiente (RelBE) o independiente del ribosoma (MazEF) (Tabla 1). Se han resuelto las estructuras tridimensionales de complejos TA, así como de antitoxinas o de toxinas libres, principalmente mediante cristalografía de rayos X y en algunos casos, mediante resonancia magnética nuclear (Blower, *et al.*, 2011b; Yamaguchi, *et al.*, 2011). Comparando las estructuras se puede observar que la mayoría de estos sistemas TA presentan homología estructural (Blower, *et al.*, 2011b) fundamentalmente en las toxinas, aunque también existen características comunes entre las distintas antitoxinas.

3.5.1. Estructura de antitoxinas

En las antitoxinas, en general, se pueden identificar dos dominios diferentes, uno de unión a DNA, generalmente localizado en su extremo N-terminal, y otro dominio de unión a su correspondiente toxina, localizado en la región C-terminal.

Dominio de unión a DNA de la antitoxina. Como se ha indicado antes, la expresión de los operones TA se suele regular negativamente por la unión de la antitoxina o del complejo TA a la correspondiente región promotora/operadora. La antitoxina es la que pilota y define la especificidad de unión a la secuencia palindrómica de la región promotora, aunque la unión del complejo TA es mucho más fuerte que la de la antitoxina sola. El dominio de unión a DNA de la antitoxina está generalmente plegado, bien en un motivo lazo-hélice-hélice (RHH, del inglés “ribbon-helix-helix”) o bien en un motivo hélice-giro-hélice (HTH, del inglés “helix-turn-helix”) (Anantharaman y Aravind, 2003; Gerdes, *et al.*, 2005). Utilizando uno de estos dos motivos, la proteína interacciona con una secuencia específica en el DNA de doble banda. El motivo RHH se ha identificado en un gran número de antitoxinas pertenecientes a diferentes familias, como RelB (Overgaard, *et al.*, 2009; Bøggild, *et al.*, 2012), FitA (Mattison, *et al.*, 2006) y CcdA (Madl, *et al.*, 2006), mientras que el motivo HTH es minoritario y se ha identificado en las antitoxinas PezA (Khoo, *et al.*, 2007), o en HipB (Schumacher *et al.*, 2009), entre otras.

En concreto, las antitoxinas pertenecientes a sistemas TA con actividad mRNA interferasas, presentan sobre todo motivos RHH en su dominio de unión a DNA. Sin embargo, en el caso de la antitoxina MazE se ha propuesto que se une a dos secuencias palindrómicas a través de un dominio de unión a DNA que se pliega formando una estructura de horquilla (*hairpin*) y contiene un gran número

de residuos cargados positivamente que estarían implicados en la interacción proteína-DNA (Figura 4) (Loris, *et al.*, 2003).

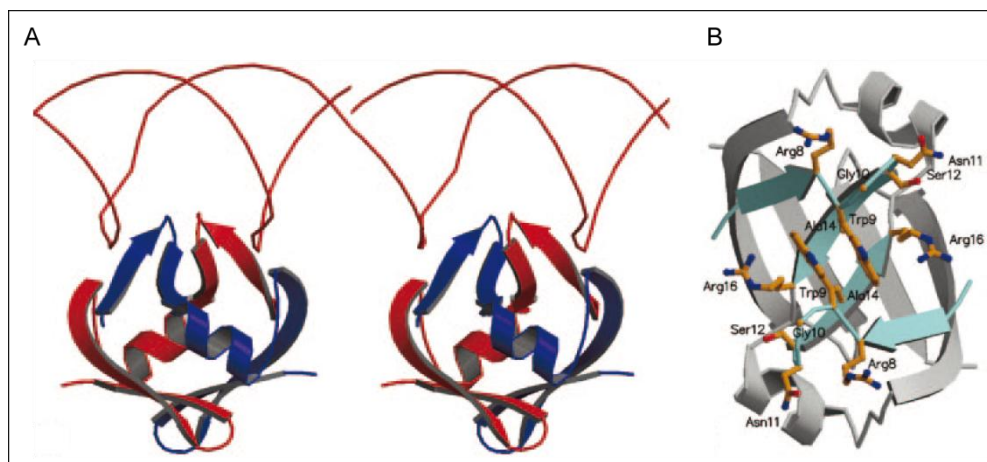


Figura 4. Representación de la unión de MazE a su DNA diana. (A) Modelado de la unión de MazE al surco mayor de DNA. (B) Representación de los residuos cargados positivamente, que posiblemente son los responsables de la interacción de la antitoxina MazE con el DNA. (Adaptado de (Loris, *et al.*, 2003).

Por otro lado, las antitoxinas RelB de *E. coli* y YefM de *E. coli* y de *M. tuberculosis* se unirían a DNA mediante un motivo RHH. Este motivo, en RelB, es homólogo al dominio de unión RHH de la familia de reguladores transcripcionales Arc-MetJ (Figura 5) (Kumar, *et al.*, 2008) y del represor transcripcional CopG del plásmido pMV158 (Gomis-Rüth, *et al.*, 1998), mientras que en YefM se asemeja al de la antitoxina Phd (Cherny y Gazit, 2004; Garcia-Pino, *et al.*, 2010).

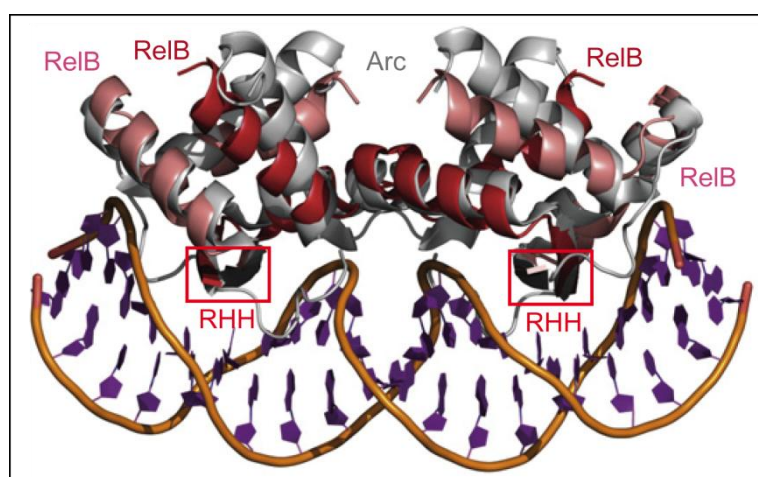


Figura 5. Representación de la unión de RelB a su DNA diana. Modelo estructural de unión de dos dímeros de RelB de *E. coli* a un DNA de doble banda utilizando como modelo la estructura cristalina del complejo Arc-DNA. RelB se une a DNA utilizando un motivo RHH. Los dos dímeros de RelB se representan en rojo y Arc en gris. (Adaptado de (Bøggild, *et al.*, 2012).

En la antitoxina MqsA, a diferencia de otras antitoxinas de la familia RelBE, es el motivo HTH el que está implicado en la unión a DNA. Además este motivo está localizado en la región C-terminal y su estabilización requiere la unión de un ion zinc a su región N-terminal (Brown, *et al.*, 2009).

Dominio de interacción antitoxina-toxina. En los sistemas TA, la interacción de la antitoxina con la toxina tiene una doble función. Por un lado, la interacción de ambas moléculas proporciona una mayor eficacia en la regulación de la expresión del operón TA. En algunas antitoxinas, como CcdA y YefM de *E. coli*, o Phd del fago P1, la interacción de la toxina con la antitoxina permite a esta última pasar de una conformación poco estructurada o desplegada a una estructura secundaria definida (Magnuson y Yarmolinsky, 1998; Cherny y Gazit, 2004; Madl, *et al.*, 2006; Garcia-Pino, *et al.*, 2010). Esta regulación alostérica por unión de la toxina contribuye a estabilizar a la antitoxina, ya que las regiones desplegadas son más susceptibles de digestión por proteasas celulares. Además, permite explicar el mecanismo de cooperatividad condicional cuando la toxina se une a moléculas de antitoxinas que están formando parte de complejos nucleoproteicos TA-DNA. Por otro lado, la formación de los complejos TA permite bloquear la actividad de la toxina. El dominio de unión a la toxina de cada antitoxina presenta un plegamiento diferente para neutralizar específicamente la toxicidad de su correspondiente toxina (Yamaguchi, *et al.*, 2011). Los modelos estructurales de complejos TA han revelado que la interacción entre ambas proteínas se produce por la combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas; sin embargo, la interacción electrostática contribuye principalmente a la especificidad de unión de la antitoxina con su toxina correspondiente (Kamada, *et al.*, 2003; Dalton y Crosson, 2010).

Muchas antitoxinas neutralizan la toxicidad de sus toxinas impidiendo su unión al sustrato, bien porque compiten con éste por el sitio activo de la toxina o bien porque enmascaran su centro activo. Aunque menos frecuentemente, la unión de las antitoxinas también puede provocar un cambio conformacional en la toxina que inhibe su actividad. En el sistema MazEF, la antitoxina MazE ocupa los sitios de interacción del sustrato a la toxina. Así, MazE en forma dimérica utiliza las dos regiones C-terminales desestructuradas para unirse cada una de ellas a un dímero de toxinas MazF, formando un complejo heterohexamérico estable $(\text{MazF})_2(\text{MazE})_2(\text{MazF})_2$ (Figura 6). El extremo C-terminal desestructurado de MazE está cargado negativamente y cubre completamente una de las hendiduras de la superficie creada entre las dos moléculas de MazF (Kamada, *et al.*, 2003). Estudios estructurales adicionales de resonancia magnética nuclear del complejo MazEF mostraron que el homodímero de MazF contiene dos sitios simétricos de unión a RNA que además pueden interaccionar con un fragmento de 24 residuos del extremo C-terminal de MazE (Li, *et al.*,

2006). De esta forma las dos moléculas de MazE bloquearían la actividad RNasa de la antitoxina MazF (Li, *et al.*, 2006).

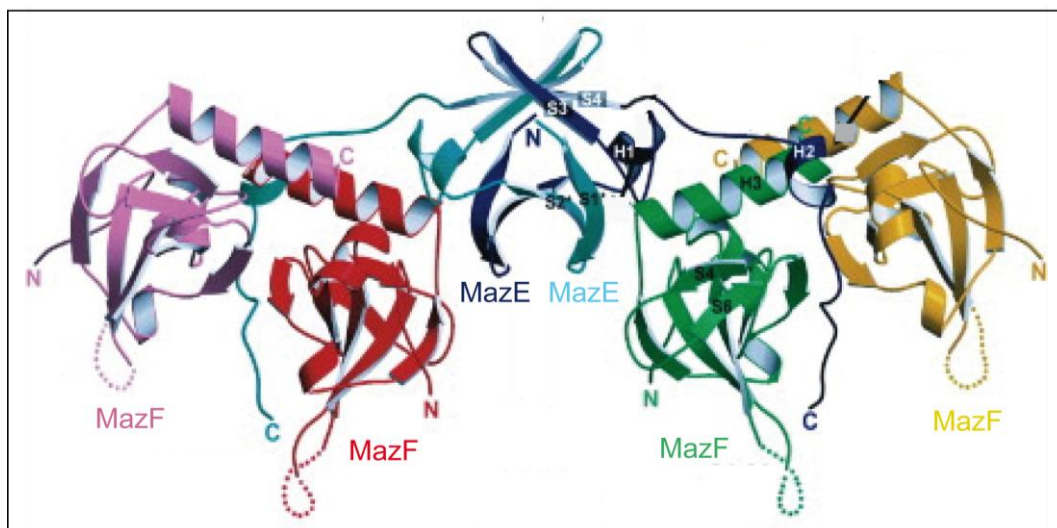


Figura 6. Estructura del complejo MazEF de *E. coli*. Las antitoxinas MazE se representan en dos tonos de azul y las toxinas en rosa, naranja, verde y amarillo. (Adaptado de Kamada, *et al.*, 2003).

En el caso de la familia RelBE están representadas estrategias muy variadas para la neutralización de la toxina. Así, la antitoxina RelB de *Pyrococcus horikoshii* (Takagi, *et al.*, 2005) establece una superficie de interacción muy extensa con la toxina, rodeando prácticamente la superficie de la toxina enmascarando de esta forma su centro activo (Figura 11). Por el contrario, en el caso de las toxinas RelB de *Methanococcus jannaschii* (Francuski y Saenger, 2009) y *E. coli* (Bøggild, *et al.*, 2012) la superficie de interacción entre la toxina y antitoxina es más limitada, bloqueando en este caso la actividad de RelE al ocupar su centro activo (Figura 11). Por último, las antitoxinas YefM (Kamada y Hanaoka, 2005) y MqsA (Brown, *et al.*, 2009) de *E. coli*, que se engloban dentro de la familia RelBE, al interaccionar con la toxina inducen un cambio conformacional en ésta, inhibiendo su actividad endonucleolítica (Kamada y Hanaoka, 2005).

3.5.2. Estructura de toxinas: unión de la toxina a su sustrato

Las toxinas que actúan como mRNA interferasas se han clasificado en dos grupos según corten el mRNA en ausencia (MazF, Kid) o en presencia (RelE) de ribosomas (Inouye, 2006; Yamaguchi y Inouye, 2009).

El modelo de las mRNA interferasas que cortan el mRNA en ausencia de ribosomas está representado por la toxina Kid. Su estructura tridimensional fue

una de las primeras determinadas y se conoce con detalle el mecanismo de interacción y corte del mRNA. Las toxinas de la familia Kid presentan una estructura globular compacta con un núcleo central de láminas β trenzadas rodeado de hélices α (Figura 7). Mediante resonancia magnética nuclear se ha analizado la interacción entre la toxina Kid y el RNA sustrato, identificando los residuos implicados en la unión a RNA (Kamphuis, *et al.*, 2006). Los residuos D75, R73 y H17 serían los catalíticos de Kid, siendo responsables del corte del RNA (Kamphuis, *et al.*, 2006). La resolución de la estructura tridimensional de la toxina kid en forma dimerica permitió identificar dos regiones simétricas de unión a RNA. Sin embargo, ensayos de espectrometría de masas, realizados con complejos Kid-RNA, indicaban que un dímero de toxina interacciona con un único RNA y esta unión impide la unión de una segunda molécula de RNA (Kamphuis, *et al.*, 2006). Además este modelo ha sido validado por el grupo de Díaz-Orejas, mediante el análisis de una colección de mutaciones en la toxina Kid implicadas en la unión y el corte de RNA (Diago-Navarro, *et al.*, 2009).

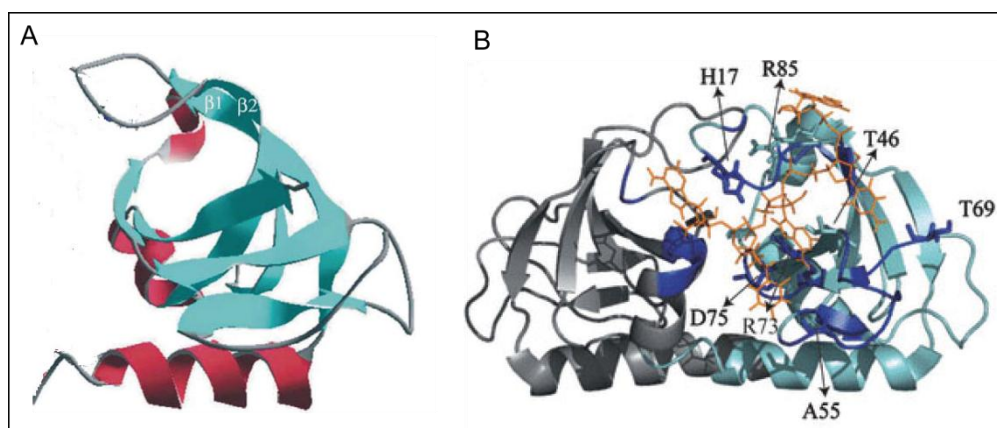


Figura 7. Estructura tridimensional de la toxina Kid. (A) Estructura tridimensional de un monómero de Kid. En azul se representan las láminas β y en rojo las hélices α . (Adaptado de (Santos-Sierra 2003)). (B) Representación de un dímero de Kid en la que se marcan los residuos implicados en la interacción a RNA. Un monómero de Kid se representa en azul y el otro en gris. (Adaptado de Diago-Navarro, *et al.*, 2009).

El grupo de mRNA interferasas que cortan el RNA sólo cuando está asociado a ribosomas, está representado por la toxina RelE. RelE comparte homología estructural con endoribonucleasas, entre otras la ribonucleasa Sa (Figura 9). RelE corta el mRNA cuando se encuentra anclado en el sitio A del ribosoma. Análisis estructurales de la proteína RelE sola y unida al ribosoma 70S de *Thermus thermophilus*, indican que RelE se une a la subunidad 30S del ribosoma ocupando el sitio A y establece contactos directos con el rRNA 16S, evitando de esta forma el acceso de factores de transcripción y tRNA al ribosoma (Neubauer, *et al.*, 2009) (Figura 8). Los detalles precisos de esta interacción se describen en el siguiente apartado.

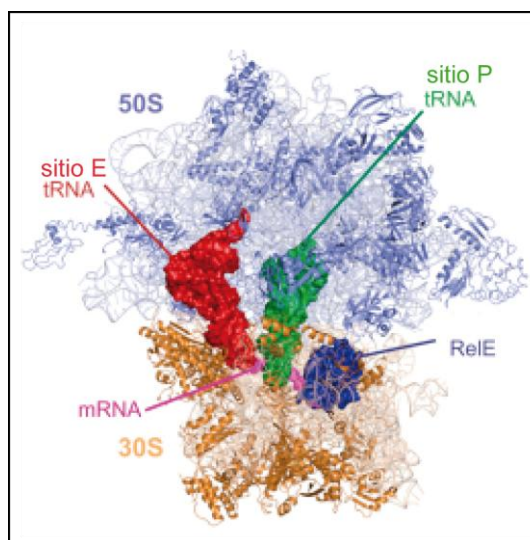


Figura 8. Estructura tridimensional del ribosoma 70S de *T. thermophilus*. La subunidad 50S se representa en azul y la 30S en marrón. RelE se ilustra en azul anclada en el sitio A del ribosoma y los tRNA en los sitios E y P se representan en rojo y verde, respectivamente. (Adaptado de Neubauer, *et al.*, 2009).

Dentro de esta familia TA se pueden incluir también las toxinas YoeB o MqsR. Ambas proteínas presentan una similitud estructural significativa con la toxina RelE, como se puede apreciar en la figura 9, aunque tanto YoeB como MqsR, a diferencia de RelE, poseen actividad endonucleolítica no ligada a ribosoma (Brown, *et al.*, 2009).

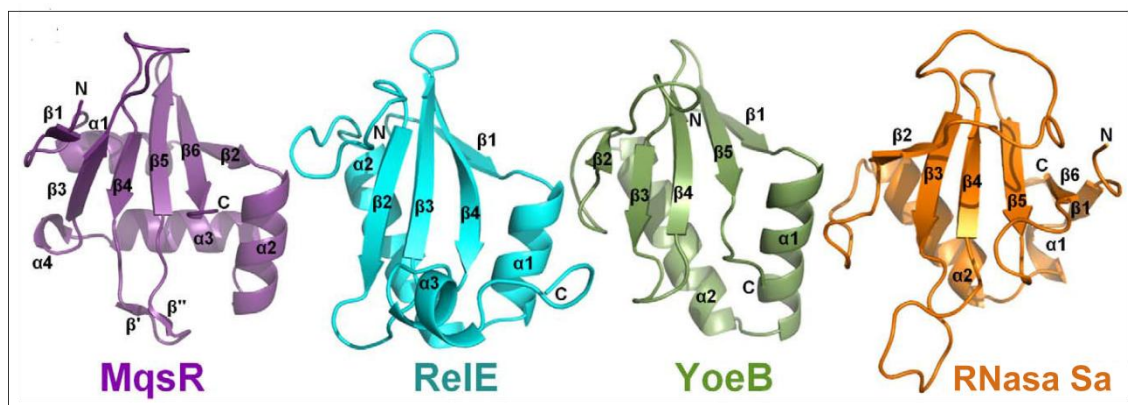


Figura 9. Similitud estructural de las toxinas de la familia RelE y de la ribonucleasa microbiana Sa. (Adaptado de Brown, *et al.*, 2009).

3.6. LA FAMILIA RelBE

Dentro de la familia RelBE, basándose en homología de secuencia y/o estructura entre las toxinas se han incluido otros sistemas como YefM-YoeB, DinJYafQ, HigAB, PrlFYhaV y, recientemente, MqsRA (Gerdes, 2000; Brown y

Shaw, 2003; Kamada y Hanaoka, 2005; Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006; Motiejunaite, *et al.*, 2007; Schmidt, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2010). En este capítulo se detallarán algunos miembros de esta familia, en concreto aquellos que se han descrito con más detalle y en los que se ha conseguido resolver su estructura tridimensional.

3.6.1. RelBE

RelBE es uno de los sistemas TA cromosómicos en el que se ha centrado gran parte de este trabajo. Es uno de los mejor caracterizados y se encuentra ampliamente extendido en bacterias y archaea, tanto en plásmidos como en cromosomas (Grønlund y Gerdes, 1999; Gerdes, *et al.*, 2005; Pandey y Gerdes, 2005). Fue descrito por primera vez en el cromosoma de *E. coli* (Christensen, *et al.*, 2001). Posteriormente se han identificado sistemas homólogos en *M. tuberculosis* (Korch, *et al.*, 2009), *P. horikoshii* (Takagi, *et al.*, 2005), *M. jannaschii* (Francuski y Saenger, 2009) y *S. pneumoniae* (Nieto, *et al.*, 2006). Este último se describe en detalle en el apartado 4.2.1.

Inicialmente el gen *relB* en *E. coli* se identificó y relacionó con la respuesta retrasada relajada (del inglés “delayed-relaxed response”). Así, cuando cultivos de *E. coli* silvestre se sometían a ayuno de aminoácidos se producía una rápida disminución en la síntesis de RNA estables (rRNA y tRNA) debido a un aumento en los niveles de alarmonas tetrafosfato (ppGpp) y pentafofosfato (pppGpp). La producción de estas alarmonas está mediada por la proteína RelA, cuya actividad se induce por la presencia de tRNAs no cargados en el sitio A del ribosoma. Por el contrario, cultivos de células de *E. coli* portadoras de mutaciones en el gen *relB* continuaban sintetizando RNA 10 minutos después de comenzar el ayuno de aminoácidos (Lavalle, 1965; Diderichsen, *et al.*, 1977; Mosteller, 1978). Este efecto asociado a los mutantes *relB* se ha relacionado con una hiperactivación de la toxina RelE, ya que en estos mutantes la antitoxina es más inestable. La hiperactivación de RelE apaga la traducción produciendo una disminución del consumo de aminoácidos y una reducción en los niveles de (p)ppGpp, permitiendo restaurar la síntesis de RNAs estables (Christensen y Gerdes, 2004).

El sistema RelBE de *E. coli* presenta la organización genética típica de los sistemas TA de tipo II y forma parte de un operón junto con RelF. El gen *relF* se encuentra *downstream* de los genes *relB* y *relE*, y es un homólogo de la toxina de tipo I Hok (Pedersen y Gerdes, 1999). El codón de terminación de *relB* solapa con los primeros codones de *relE*, lo que indica un acoplamiento traduccional entre ambos genes (Gerdes, 2000). Además, se ha confirmado que aunque en condiciones de crecimiento favorables la expresión del operón es mínima, el número de moléculas de RelB es, aproximadamente, 10 veces superior al de RelE, lo cual asegura un bloqueo efectivo de la actividad de RelE (Overgaard, *et al.*, 2009). En cultivos de *E. coli* sometidos a estrés nutricional por ayuno de

aminoácidos se produce una activación de la proteasa celular Lon. Esta proteasa degrada RelB y, como consecuencia, aumentan tanto los niveles de transcripción del operón *relBE* como los de toxina libre. RelE libre provoca la parada del crecimiento celular al bloquear la traducción (Christensen, *et al.*, 2001; Gotfredsen y Gerdes, 2002). RelE interfiere con el proceso de traducción celular promoviendo roturas endonucleolíticas en el mRNA unido a ribosomas (Christensen y Gerdes, 2003). Los primeros análisis de la actividad enzimática de RelE indicaron que la rotura del mRNA se producía entre la segunda y tercera base del codón situado en el sitio A del ribosoma, aunque exhibía una mayor preferencia de corte por los codones de terminación UAG y UGA y el codón CAG (Pedersen, *et al.*, 2003). Estudios más recientes y realizados *in vivo*, revelaron que RelE corta frecuente y eficientemente dentro de los primeros 100 codones del mRNA y sólo ocasionalmente lo hace en regiones próximas a la región 3'. Además las roturas en el mRNA se producen tanto entre la segunda y tercera base del codón como detrás de la tercera base (Hurley, *et al.*, 2011). La resolución de la estructura tridimensional de RelE sola y unida al ribosoma 70S de *T. thermophilus*, en el estado previo al corte y en el posterior, ha permitido conocer el mecanismo de corte de mRNA mediado por RelE (Neubauer, *et al.*, 2009). RelE interacciona con la subunidad 30S ocupando el sitio A del ribosoma (Figura 10). RelE, una vez anclado en el ribosoma, desplaza al mRNA hacia su centro activo, provocando su reorientación y posterior rotura. La reorientación del mRNA está mediada por el residuo Y87 de RelE y el residuo C1054 del rRNA 16S, y son esenciales para promover la hidrólisis de un 2'-OH entre la segunda y tercera posición del codón. Estos datos indican que no solo RelE sino también el rRNA 16S son necesarios en la catálisis. Por otro lado, la interacción directa de RelE con el rRNA 16S impide el acceso de factores de traducción y de tRNA al ribosoma bloqueando así la traducción. (Neubauer, *et al.*, 2009).

Además, se ha observado que RelE es capaz de cortar mRNA situados en el sitio A de ribosomas eucarióticos (Andreev, *et al.*, 2008) y mitocondriales (Temperley, *et al.*, 2010). Como consecuencia del corte del mRNA, los ribosomas se quedarían anclados al mRNA dañado. En bacterias, los ribosomas atrapados durante la traducción pueden ser rescatados mediante un proceso denominado trans-traducción (Keiler, *et al.*, 1996) en el que está implicada una molécula de RNA regulador llamado tmRNA. El tmRNA presenta características estructurales comunes tanto a tRNA y como a mRNA. El tmRNA incluye un dominio muy similar a tRNA^{Ala}, aminoacetilado en su extremo CCA 3' y además codifica una corta secuencia de etiquetado (*tag*) de proteasas celulares (Keiler, *et al.*, 1996). El tmRNA entra en el sitio A vacío del ribosoma anclado y añade su alanina, así como la secuencia de etiquetado, facilitando la liberación del polipéptido del ribosoma y su posterior degradación por proteasas celulares (Keiler, *et al.*, 1996). Este proceso de trans-traducción (que permite liberar los ribosomas y aumentar los niveles de aminoácidos reutilizables en la síntesis de nuevas proteínas), puede verse afectado cuando se activa la toxina RelE, la cual

reconoce al tmRNA como sustrato e impide el desbloqueo del ribosoma (Gerdes, *et al.*, 2005).

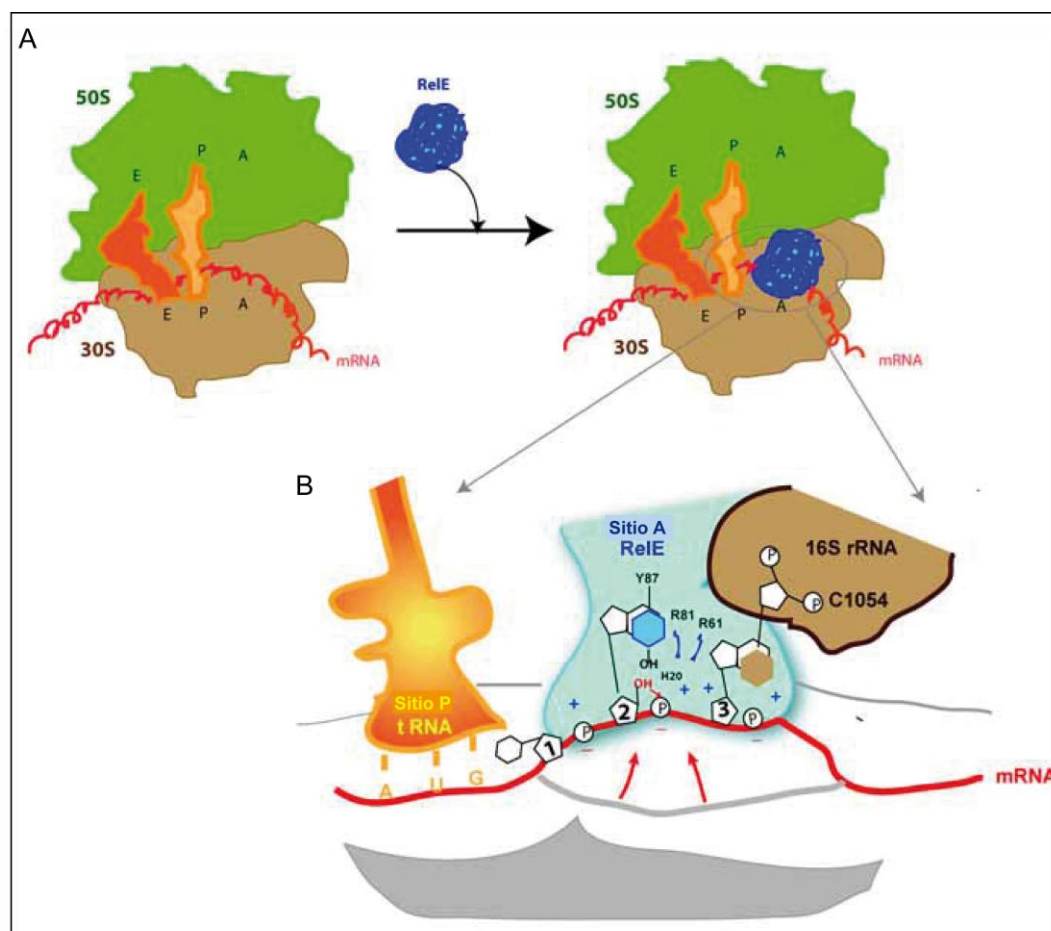


Figura 10. Mecanismo de corte del mRNA catalizado por la proteína RelE asociada al sitio A del ribosoma. (A) Representación esquemática de la unión de RelE al ribosoma. Se muestran los sitios ribosomales implicados en la traducción, E, P y A. (B) Modelo de la reacción endonucleolítica del mRNA transcrito. RelE se une al mRNA por su sitio activo a través de interacciones entre las cadenas básicas (+) de los residuos R45, R81, R61, K52, K54 y R56, y el grupo fosfato del mRNA (-). Se muestra el segundo nucleótido con el residuo Y87 y al tercer nucleótido con el residuo C1054 del rRNA 16S. Las flechas rojas indican el ataque nucleofílico de 2'-OH del grupo fosfato. También se muestran la molécula de agua y los residuos R61 y R81 presentes en el sitio activo de RelE. (Adaptado de Díaz-Orejás, *et al.*, 2010).

Como el resto de sistemas TA, el complejo RelBE parece regular su propia transcripción uniéndose a su región operadora (Gerdes, *et al.*, 2005). RelB se uniría por su extremo N-terminal a una secuencia operadora próxima a, o solapante con, el promotor del operón *relBE* (Gerdes, *et al.*, 2005). En este complejo proteico que actúa como un represor transcripcional, RelB pilota la unión del complejo RelBE al DNA, mientras que la toxina RelE funcionaría como

co-represor, de manera que no interaccionaría con el DNA pero aumentaría la afinidad de RelB por su diana (Overgaard, *et al.*, 2008). Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo de autorepresión. Por un lado, el grupo de Inouye propone que, en solución, el complejo RelBE se asociaría formando un heterotetrámero $(\text{RelB})_2(\text{RelE})_2$ y serían dos heterotetrámeros los que cubrirían la secuencia operadora, que comprende una secuencia repetida invertida de 6 pb y la secuencia de Shine-Dalgarno (5'ATTTGTAATTACAAGAGGT) (Li, *et al.*, 2008). Por otro lado, el grupo de Gerdes propone que sería un heterotrímero $(\text{RelB})_2\text{RelE}$ el que se uniría inicialmente al DNA operador para, de forma cooperativa, asociarse a otro complejo heterotrimérico y este heterohexámero cubriría la región promotora bloqueando de esta forma la transcripción (Overgaard, *et al.*, 2008).

Por otro lado, la resolución de la estructura tridimensional del complejo $(\text{RelB})_2(\text{RelE})_2$ de *E. coli*, obtenida en condiciones de exceso de toxina, para favorecer la cooperatividad condicional, ha permitido establecer las bases estructurales de este mecanismo de regulación (Bøggild, *et al.*, 2012). El complejo RelBE generado en condiciones de exceso de toxina RelE es un heterotetrámero $\text{RelE}-(\text{RelB})_2-\text{RelE}$ con una estructura en forma de V y con el dominio de dimerización de RelB en el ápice (Bøggild, *et al.*, 2012) (Figura 11A). En el extremo N-terminal la dimerización de dos moléculas de RelB genera un motivo de unión a DNA de tipo RHH (Cherny, *et al.*, 2007; Li, *et al.*, 2008; Bøggild, *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque el complejo contiene este motivo de unión a DNA, una superposición estructural del heterotetrámero con el represor Arc unido a su DNA operador, sugiere que la proximidad de los dos sitios de unión en el DNA del heterotetrámero provocaría el solapamiento de dos moléculas de RelE situadas en los extremos del complejo (Bøggild, *et al.*, 2012) y por tanto, impediría su unión a la secuencia operadora (Bøggild, *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta los impedimentos estéricos que presenta el heterotetrámero para interaccionar con el DNA, se ha propuesto que sería el heterotrímero la molécula implicada en autoregulación, como indicaban los resultados previos del grupo de Gerdes, mientras que la configuración heterotetramérica explicaría el mecanismo de cooperatividad condicional (Figura 3) (Bøggild, *et al.*, 2012). Aunque RelBE de *E. coli* es el sistema que se ha caracterizado con más detalle, también se ha resuelto la estructura tridimensional del complejo RelBE de *P. horikoshii* (RelBE_{Ph}) (Takagi, *et al.*, 2005) y *M. jannaschii* (RelBE_{Mj}) (Francuski y Saenger, 2009). Ambos complejos forman un heterotetrámero $(\text{RelB})_2(\text{RelE})_2$ pero las estructuras difieren notablemente: en el heterotetrámero de RelBE_{Ph} , la antitoxina rodea a la toxina y la interacción entre los dos heterodímeros se produce a través de las toxinas que comparten la misma superficie de interacción (Takagi, *et al.*, 2005; Shinohara, *et al.*, 2010) (Figura 11C), mientras que en el heterotetrámero de RelBE_{Mj} la antitoxina se sitúa en el centro del complejo cubriendo el posible centro activo de la toxina; en este caso, el contacto entre los heterodímeros se produce entre las antitoxinas (Francuski y

Saenger, 2009) (Figura 11B). En el complejo RelBE_{Mj} las antitoxinas dimerizan pero, a diferencia del complejo RelBE de *E. coli*, no forman un dominio de unión a DNA tipo RHH. Las toxinas RelE de *M. jannaschii*, *P. horikoshii* y *E. coli* presentan una baja identidad de secuencia pero un plegamiento común. Además, mediante la superposición de la estructura y la secuencia de aminoácidos, se observó que existen varios residuos altamente conservados, como R57, R62, Y84 y D43 que pueden tener un papel esencial en la actividad catalítica de RelE (Francuski y Saenger, 2009).

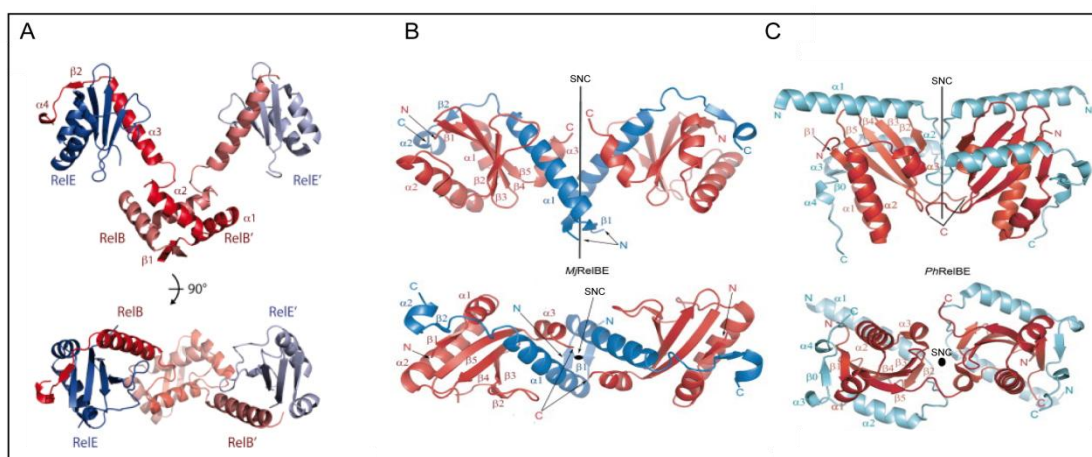


Figura 11. Estructura tridimensional del complejo RelBE de *E. coli*, *M. jannaschii* y *P. horikoshii*. (A) Estructura tridimensional del complejo RelBE de *E. coli*. En rojo se representa la antitoxina RelB y en azul la toxina RelE. (B) Complejo RelBE de *M. jannaschii*. En azul se representa la antitoxina RelB y en rojo la toxina RelE. (C) Complejo RelBE de *P. horikoshii*. En azul se representa la antitoxina RelB y en rojo la toxina RelE. Se indican los elementos de estructura secundaria y el eje de simetría no cristalográfica (SNC). (Adaptado de Francuski y Saenger, 2009; Bøggild, *et al.*, 2012).

3.6.2. YefMYoeB

El sistema YefMYoeB mejor caracterizado es el del cromosoma de *E. coli*. Este sistema se identificó inicialmente por su homología con el sistema AxeTx del plásmido pRUM de *Enterococcus faecium* (Grady y Hayes, 2003). La sobreexpresión de la toxina YoeB en *E. coli* induce la inhibición del crecimiento celular, pero esta inhibición es neutralizada por la inducción de la expresión de la antitoxina YefM (Grady y Hayes, 2003). La antitoxina YefM es degradada por proteasas Lon dejando libre a la toxina YoeB que de esta forma puede actuar sobre su diana celular (mRNA) (Christensen, *et al.*, 2004).

Se ha resuelto la estructura tridimensional de la toxina de *E. coli* YoeB sola y acomplejada con la antitoxina YefM (Figura 12). YoeB muestra una estructura similar a RNasas microbianas como la RNasa Sa y Barnasa, y a la toxina RelE (Kamada y Hanaoka, 2005). YefM pertenece a una familia única de proteínas de unión a DNA con un peculiar plegamiento que se ha denominado

superfamilia Phd/YefM (Anantharaman y Aravind, 2003). La estructura del complejo YefMYoeB reveló que la estequiometría es $(\text{YefM})_2\text{YoeB}$ y que uno de los extremos C-terminal del homodímero de YefM interacciona con YoeB mientras que el otro extremo C-terminal está desordenado (Kamada y Hanaoka, 2005) (Figura 12A). La comparación de las estructuras de YoeB sola y formando el complejo heterotrimérico con YefM, indicó que la interacción con YefM produce un cambio conformacional del sitio catalítico de YoeB que genera una toxina catalíticamente inactiva (Kamada y Hanaoka, 2005).

Además, se ha resuelto la estructura tridimensional de YefM de *M. tuberculosis* (Kumar, *et al.*, 2008). En el cristal se pudo identificar un dominio N-terminal compacto y un dominio C-terminal flexible que adopta diferentes conformaciones en diferentes monómeros (Kumar, *et al.*, 2008) (Figura 12B). El extremo N-terminal incluye un motivo RHH que, como en otras proteínas de la familia, podría estar mediando la unión de la antitoxina o el complejo a su DNA diana. Los contactos con YoeB se realizan fundamentalmente a través de la región C-terminal y su flexibilidad permitiría el control de la actividad de la toxina (Kumar, *et al.*, 2008).

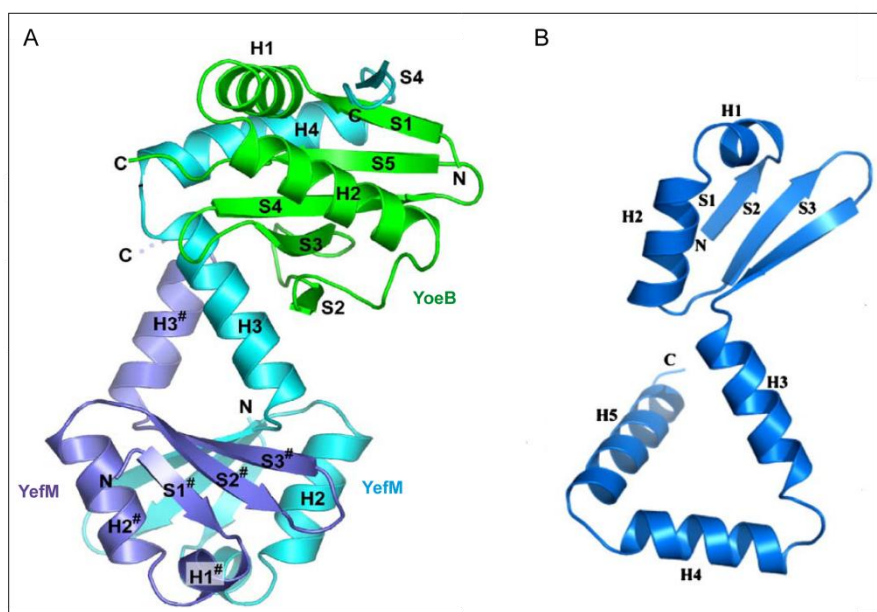


Figura 12. Estructura tridimensional del complejo YefMYoeB de *E. coli* y YefM de *M. tuberculosis*. (A) Estructura tridimensional del complejo YefMYoeB de *E. coli*. Las antitoxinas YefM se representan en azul y violeta y la toxina YoeB en verde. (B) Estructura tridimensional de la antitoxina YefM de *M. tuberculosis*. (Adaptado de Kamada y Hanaoka, 2005).

YoeB corta mRNAs de manera dependiente del ribosoma, ya que se ha comprobado que corta mRNA *in vivo* cuando se están traduciendo y el corte tiene lugar en regiones situadas en el marco de lectura del ribosoma (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008). Además, se ha observado que YoeB corta RNAs en ausencia de ribosoma, en el extremo 3' de regiones que

contengan purinas pero sin especificidad de secuencia (Kamada y Hanaoka, 2005). El grupo de Inouye ha propuesto que YoeB previene la formación del complejo de iniciación de la traducción (Zhang y Inouye, 2009) y es esta actividad la que inhibiría inicialmente la traducción. YoeB se uniría a la subunidad 50S del ribosoma 70S interaccionando con el sitio A e impediría la formación del complejo de iniciación provocando la inhibición de la síntesis de proteínas. Esta inhibición activaría la actividad endoribonucleasa de los ribosomas o de YoeB produciendo el corte del mRNA en el sitio A liberándose del ribosoma la región 3' del mRNA.

YefMYoeB, como el resto de sistemas TA, está autoregulado transcripcionalmente: la unión de la antitoxina YefM a la región operadora conduce a una disminución en los niveles de transcripción del operón, siendo la represión más eficiente cuando es el complejo TA el que se une a esta región reguladora (Kedzierska, *et al.*, 2007). La región operadora a la que se une YefM o YefMYoeB incluye dos secuencias palindrómicas adyacentes de distinto tamaño pero con un motivo central común: 5'- TGTACA-3' (Kedzierska, *et al.*, 2007). El trímero (YefM)₂-YoeB podría unirse a cada una de estas repeticiones mediante el motivo RHH que se encuentra en la región N-terminal de la antitoxina, generándose un heterohexámero en la región operadora responsable de la inhibición de la transcripción del operón.

Recientemente, se ha confirmado una activación cruzada entre dos sistemas TA, en concreto VapBC y YefMYoeB. La inducción de la expresión de la toxina VapC activa la proteasa Lon que al degradar la antitoxina YefM permite la activación de YoeB (Winther y Gerdes, 2009). Estos resultados confirmarían el papel esencial que se le había adjudicado a Lon en la activación específica de la toxina YoeB (Gerdes y Van Melder, 2004).

3.6.3. MqsRA

El locus *mqsRA*, previamente denominado *ygiUT*, y en particular *mqsR*, se identificó como uno de los genes que aumentaban su expresión en *biofilms* de *E. coli* (Ren, *et al.*, 2004). El análisis de mutaciones en este locus mostró que la aparición de células persistentes disminuía considerablemente en los mutantes (Ren, *et al.*, 2004). A partir de este hallazgo se han encontrado homólogos de este locus en un gran número de proteobacterias (Gonzalez-Barrios, *et al.*, 2006).

En el operón *mqsRA* el orden de los genes no es el típicamente descrito en los sistemas TA: el primer gen (*mqsR*) codifica la toxina y el segundo (*mqsA*) la antitoxina. MqsRA es uno de los sistemas TA, junto con HicAB y HigAB, que presenta esta organización genética (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006; Jorgensen, *et al.*, 2009). Sin embargo, como en otros sistemas TA, la inducción de la expresión de la toxina MqsR inhibe el crecimiento de *E. coli* y la producción de MqsA puede revertir este efecto incluso horas después de la expresión de

MqsR, lo que demuestra que MqsR no produce la muerte de la bacteria (Christensen-Dalsgaard, *et al.*, 2010; Kasari, *et al.*, 2010). La activación de MqsR produce una elongación de las células bacterianas (Kasari, *et al.*, 2010) y una rápida parada de la síntesis de proteínas (Christensen-Dalsgaard, *et al.*, 2010; Kasari, *et al.*, 2010). MqsR es una endoribonucleasa que corta mRNAs *in vivo* e *in vitro* en ausencia de ribosomas (Yamaguchi, *et al.*, 2009; Christensen-Dalsgaard, *et al.*, 2010). MqsR corta RNA antes o después de una guanina en secuencias GCU preferentemente y también secuencias GCA/G/C (Yamaguchi, *et al.*, 2009; Christensen-Dalsgaard, *et al.*, 2010).

Las estructuras de MqsR y MqsA se han resuelto por cristalografía de rayos X. La estructura cristalina muestra que la toxina MqsR es una proteína globular que adopta un plegamiento similar a las toxinas RelE y YoeB (Figura 9). Por el contrario, la antitoxina MqsA es una proteína elongada compuesta por dos dominios estructurales diferentes, un dominio de unión a DNA con un motivo HTH localizado en el extremo C-terminal y un motivo zinc *finger* en el extremo N-terminal, que utiliza para unir un ion zinc y estabilizar la estructura de la antitoxina (Brown, *et al.*, 2009) (Figura 13). Se han descrito y purificado complejos de MqsR-MqsA con diferente estequiometría: un heterotetrámero compuesto por un dímero de MqsR y un dímero de MqsA (Brown, *et al.*, 2009) y un heterohexámero compuesto por dos dímeros de MqsR y un dímero de MqsA (Yamaguchi, *et al.*, 2009).

La antitoxina MqsA y el complejo MqsRA se unen a dos secuencias palindrómicas (5'ACCTTTTAGGT) localizadas a ambos lados de la caja -35 de la región promotora (Yamaguchi, *et al.*, 2009) y de esta forma regulan su propia transcripción. Se ha resuelto la estructura cristalina de MqsA unida a su DNA diana (Brown, *et al.*, 2011). La antitoxina MqsA en forma dimérica contacta con dos surcos mayores del DNA mediante el motivo HTH localizado en la región C-terminal (Brown, *et al.*, 2011). La unión de MqsA induce una curvatura en el DNA acompañada de una reorganización de algunos dominios de la proteína de manera que el dominio N-terminal contacta con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA estabilizando el complejo (Brown, *et al.*, 2011) (Figura 13C).

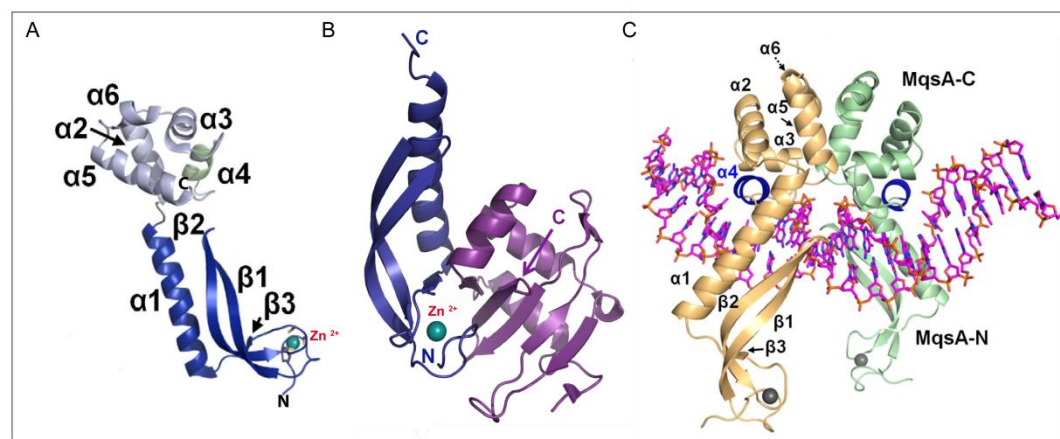


Figura 13. Estructura tridimensional de MqsRA. (A) Estructura de un monómero de la antitoxina MqsA. Se indican cada uno de los elementos estructurales de la antitoxina y la localización del ión Zn^{2+} en su extremo N-terminal. (B) Estructura del complejo MqsRA. En morado se representa un monómero de MqsR y en azul el extremo N-terminal de MqsA. (C) Estructura dimérica de MqsA unida a su DNA diana. Un monómero de MqsA se representa en verde y el otro en beige. (Adaptado de Brown, *et al.*, 2009).

Una característica importante de este sistema es que la antitoxina MqsA puede unirse específicamente, no sólo a secuencias operadoras del operón *mqsRA*, sino a otras secuencias localizadas en regiones promotoras de genes como *cspD*, *mcbR*, *spy*, *bssR* y *rpoS*; estos genes se han relacionado, directa o indirectamente, con la formación de *biofilms* en *E. coli*, lo que explicaría el papel de este módulo TA en la generación de estos ecosistemas bacterianos (Wang y Wood, 2011).

4. *Streptococcus pneumoniae*: RELEVANCIA Y SISTEMAS TA

4.1. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (pneumococo) es un patógeno G+ causante de múltiples enfermedades humanas, desde una infección asintomática leve a una infección severa como la neumonía bacteriana aguda (Hoskins, *et al.*, 2001). Las infecciones pneumocócicas producen altas tasas de morbilidad y mortalidad en niños, adultos y ancianos. *S. pneumoniae* es el agente causal de neumonía, meningitis, otitis media aguda, sepsis e infecciones nosocomiales. La bacteria es responsable de la muerte de casi 2 millones de niños menores de 5 años al año, más que SIDA, malaria y tuberculosis juntas (O'Brien, *et al.*, 2009). *S. pneumoniae* se encuentra en la superficie del tracto respiratorio superior donde coloniza entre el 5 y 70% de individuos sanos, dependiendo de las condiciones geográficas, estacionales y socioeconómicas (Bogaert, *et al.*, 2004). Desde su nicho natural se puede extender para invadir nuevos tejidos o individuos que

pueden desarrollar la enfermedad cuando su sistema inmunológico está comprometido.

S. pneumoniae se puede considerar como un reservorio de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, debido a su capacidad de transformación natural con DNA exógeno y a su capacidad hiper-recombinogénica (Hanage, *et al.*, 2009). La transferencia horizontal de DNA entre especies de *Streptococcus* relacionadas se ha demostrado por la determinación de una organización en mosaico de algunos factores de virulencia como las proteínas de unión a colina y penicilina (Moscoso, *et al.*, 2010). La eficacia del tratamiento contra infecciones pneumocócicas se ha reducido debido al incremento del número de aislados clínicos de *S. pneumoniae* que presentan resistencia a antibióticos (Gamez y Hammerschmidt, 2012) y a la caracterización de estirpes virulentas deficientes en la cápsula que no son tipificables (Park, *et al.*, 2012a). Existe una vacuna para la prevención de infecciones pneumocócicas, pero no protege frente a todos los serotipos existentes y no confiere una buena protección en individuos menores de dos años y mayores de 60 (Mitchell, 2000). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para combatir las infecciones pneumocócicas. Para abordar este reto, es importante por un lado, conocer la distribución de los serotipos, la frecuencia de aparición de resistencias a antibióticos y la frecuencia de estirpes no tipificables. Por otro lado, es necesario identificar y caracterizar nuevas dianas de intervención mediante el estudio de las interacciones hospedador-patógeno y validar estas dianas en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* para identificar candidatos potenciales para la prevención y la terapia (Chan, *et al.*, 2012). Se han sugerido diversas estrategias (la mayoría de ellas complementarias) para hacer frente a las infecciones pneumocócicas, tales como: i) rotación en los tratamientos antibióticos (Alonso, *et al.*, 2007); ii) vacunación con vacunas más polivalentes (como mínimo 13 y 20-valentes) (O'Brien, *et al.*, 2009); iii) estudio de factores de virulencia claves que se conservan en todos los genomas secuenciados (Marra, *et al.*, 2004); iv) terapia con bacteriófagos; v) determinación funcional del microbioma humano de un gran número de pacientes; vi) síntesis de nuevas moléculas con actividad anti-pneumocócica (Arkin y Wells, 2004); y vii) uso de nuevas estrategias como por ejemplo el uso de las toxinas de los sistemas TA como dianas potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Alonso, *et al.*, 2007; Mutschler y Meinhart, 2011). Un buen antibiótico podría ser un inhibidor que mimetice los residuos más importantes de la toxina y sus interacciones con la antitoxina, lo que conduciría a la formación de un nuevo complejo ineficiente que retiraría la antitoxina activa, dejando libre la toxina, pudiendo ésta desarrollar su acción citotóxica (Alonso, *et al.*, 2007).

4.2. SISTEMAS TA EN *S. pneumoniae*

En el cromosoma de *S. pneumoniae* se han identificado hasta 10 sistemas homólogos a otros previamente descritos como módulos TA. Inicialmente se identificaron los sistemas RelBE1*Spn*, RelBE2*Spn*, YefM-YoeB*Spn*, HigBA, Phd/Doc, PezAT, TasAB, HicAB (Pandey y Gerdes, 2005; Fico y Mahillon, 2006; Jorgensen, *et al.*, 2009). Recientemente, una búsqueda bioinformática en el genoma de las 48 estirpes de *S. pneumoniae* cuya secuencia está disponible en la base de datos NCBI, ha permitido encontrar dos posibles sistemas TA en el genoma de *S. pneumoniae*: Xre-COG2856 y Xre-Bro (Chan, *et al.*, 2012). De todos los sistemas TA presentes en el genoma de *S. pneumoniae*, sólo tres de ellos, RelBE2*Spn* (Nieto, *et al.*, 2006), YefM-YoeB*Spn* (Nieto, *et al.*, 2007) y PezAT (Khoo, Loll *et al.*, 2007) han sido caracterizados como sistemas TA genuinos, mientras que los restantes están pendientes de validación.

4.2.1. RelBE2

En el cromosoma de *S. pneumoniae* se han identificado dos loci *relBE* (Gerdes, 2000), denominados *relBE1Spn* y *relBE2Spn*. La transcripción regulada de los genes *relE1Spn* y *relE2Spn*, que codifican las toxinas en estos sistemas, indicaba que sólo la sobreexpresión de la toxina RelE2*Spn* era tóxica en *E. coli* (K. Gerdes, resultados no publicados) mientras que la sobreproducción de RelE1*Spn* de pneumococos resultó ser inocua (W. T. Chan, resultados no publicados). El alineamiento de secuencias de RelE1*Spn* y RelE2*Spn* con la proteína RelE de *P. horikoshii* mostró que la proteína RelE1*Spn* exhibía una diferencia significativa tanto en la distribución de carga como en los residuos posiblemente implicados en la actividad RNasa de la toxina (Nieto, *et al.*, 2006), observación que se confirmó cuando se resolvió la estructura de RelE de *E. coli* (Figura 9) (Neubauer, *et al.*, 2009). El sistema RelBE2*Spn*, sin embargo, es un sistema TA genuino. Así, la sobreproducción de la toxina RelE2*Spn* en células de *E. coli* produjo una parada del crecimiento celular que pudo ser revertida por la inducción de la expresión de la antitoxina RelB2*Spn* pero sólo durante un corto periodo de tiempo. Una exposición prolongada de las células a niveles altos de la toxina impidió a las células de *E. coli* recuperar su capacidad de crecimiento, incluso después de la inducción de la síntesis de la antitoxina RelB2*Spn* (Nieto, *et al.*, 2006).

El locus *relBE2Spn* presenta una organización genética similar a otros módulos *relBE*: está organizado en un operón en el cual el gen de la antitoxina precede al de la toxina (Figura 14A) (Nieto, *et al.*, 2006). Los genes *relB2Spn* y *relE2Spn* presentan un acoplamiento traduccional, es decir, los últimos codones del gen *relB2Spn* solapan con el codón de iniciación de *relE2Spn* (Nieto, *et al.*, 2006). Los genes *relB2Spn* y *relE2Spn* son transcritos como un único mRNA desde un único promotor, denominado P_{rel} (Nieto, *et al.*, 2006). Se han identificado las posibles secuencias -35 y -10, separadas por un espaciador de

17 nucleótidos, así como una posible secuencia de Shine-Dalgarno para unión de los ribosomas (Figura 14B) (Nieto, *et al.*, 2006).

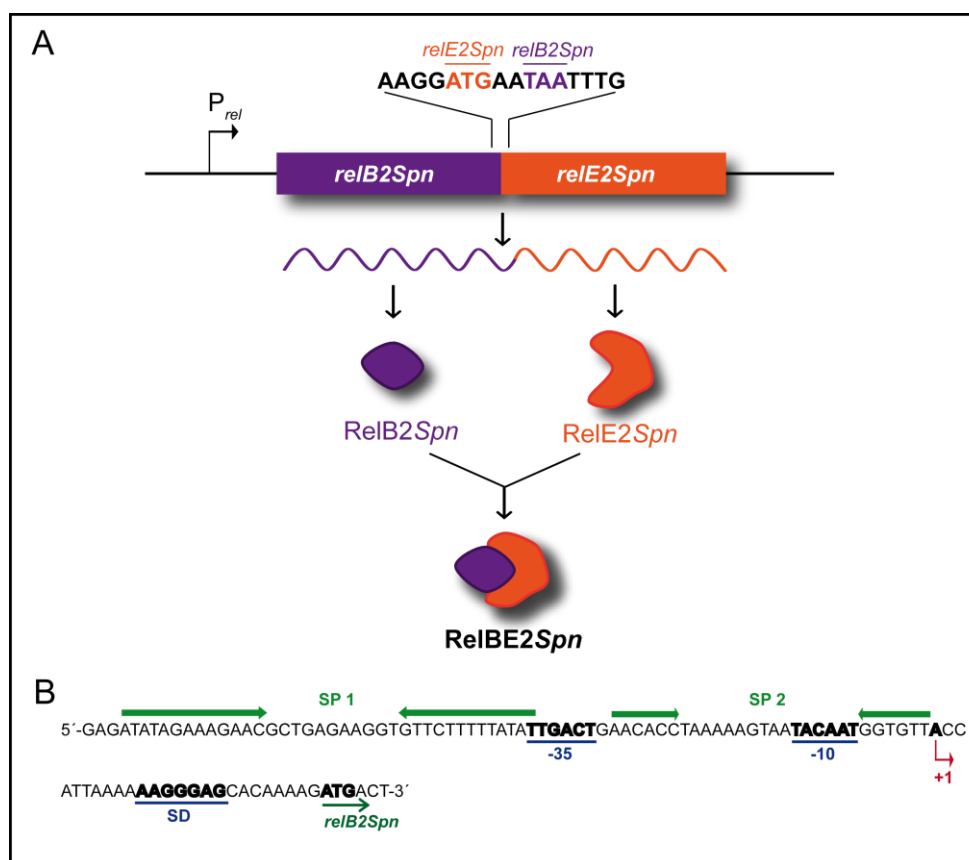


Figura 14. Organización genética del operón *relBE2Spn*. (A) El locus *relBE2Spn* está organizado en un operón en el cual el gen de la antitoxina *relB2Spn* precede al gen de la toxina *relE2Spn*. Ambos genes son transcritos como un único mRNA a partir del promotor P_{rel} . En la parte superior se señala el posible acoplamiento traduccional entre ambos genes. El codón de terminación de *relB2Spn* (TAA, letras en color morado) se localiza dentro de la región codificante de *relE2Spn* (ATG, codón de iniciación de *relE2Spn*, letras en color naranja). (B) Secuencia de nucleótidos de la región promotora del operón *relBE2Spn*. Se indican en azul las secuencias -35, -10 y el sitio de unión a ribosomas Shine-Dalgarno (SD). El sitio de inicio de la transcripción (+1) se señala con una flecha roja y el sitio de inicio de la traducción (ATG) con una flecha verde. Las flechas verdes convergentes señalan dos secuencias palindrómicas (SP) SP 1 y SP 2.

4.2.2. YefMYoeB

El sistema YefMYoeBSpn de *S. pneumoniae* fue identificado debido a su similitud de secuencia con el sistema YefMYoeB de *E. coli* (Pandey y Gerdes, 2005; Nieto, *et al.*, 2007). La funcionalidad del sistema pneumocócico se ensayó en *E. coli*, donde se observó que la sobreproducción de la toxina YoeBSpn producía una parada del crecimiento celular (Nieto, *et al.*, 2007). Esta parada podía ser revertida con la producción de la antitoxina YefMSpn dependiendo del

tiempo de exposición a la toxina lo que indicaba que existe un marco temporal (“time-frame window”) para el rescate por parte de la antitoxina al igual que ocurre con RelBE2*Spn* (Nieto, *et al.*, 2007).

YefMYoeB*Spn* presenta la organización genética típica de los operones TA. El gen de la antitoxina YefM*Spn* precede al de la toxina YoeB*Spn* y ambos genes son transcritos como un único mRNA, en este caso los genes no presentan solapamiento traduccional y están separados por tres nucleótidos (el codón de terminación TGA) (Figura 15A) (Chan, *et al.*, 2011). Por otro lado, este locus presenta un elemento singular de regulación, que no se ha identificado en otros sistemas TA, una secuencia BOX AC localizada *upstream* del promotor P_{yefM2} del operón. Los elementos BOX son secuencias repetidas, quizás móviles, que se encuentran en las regiones intergénicas del genoma de *S. pneumoniae* y especies relacionadas (Hoskins, *et al.*, 2001). Un elemento BOX consenso presenta tres módulos: boxA, boxB y boxC, de aproximadamente 50 pb cada uno (Martin, *et al.*, 1992). Aunque la función de los elementos BOX es desconocida, se ha propuesto que aumentan la expresión de genes incrementando la vida media de mRNAs o actuando como un sitio de unión de proteínas reguladoras (Knutsen, *et al.*, 2006; Croucher, *et al.*, 2009). En el caso de YefMYoeB*Spn* la secuencia del elemento BOX AC (compuesto por los módulos boxA y boxC) proporciona un promotor adicional P_{yefM1} (Figura 15B) (Chan, *et al.*, 2011). Ensayos de fusiones transcripcionales en *E. coli* demostraron que el promotor P_{yefM1} es 15 veces más débil que el promotor P_{yefM2}, y además no estaría regulado por la antitoxina YefM*Spn* o el complejo YefMYoeB*Spn* (Chan, *et al.*, 2011), observación que se confirmó al comprobar, mediante ensayos de *footprinting*, que las proteínas YefM y YoeB no se unen al promotor P_{yefM1}. Los ensayos de fusiones transcripcionales permitieron observar, además, que en presencia de la antitoxina (suministrada en *cis*) la actividad del promotor P_{yefM1} era mayor que la del promotor P_{yefM2} solo, indicando un aumento en la actividad de este promotor (Chan, *et al.*, 2011). Esta activación se podría deber al elemento BOX AC o a algún otro elemento desconocido de la secuencia entorno al promotor, que podría actuar de sitio de unión de factores de la bacteria huésped aún sin identificar. El mecanismo por el cual se produce esta activación se desconoce aún, pero el elemento BOX AC parece ejercer algún papel en la regulación de este sistema TA ya que está conservado en todas las estirpes de *S. pneumoniae* secuenciadas que presentan un locus *yefMyoeB* (Chan, *et al.*, 2012).

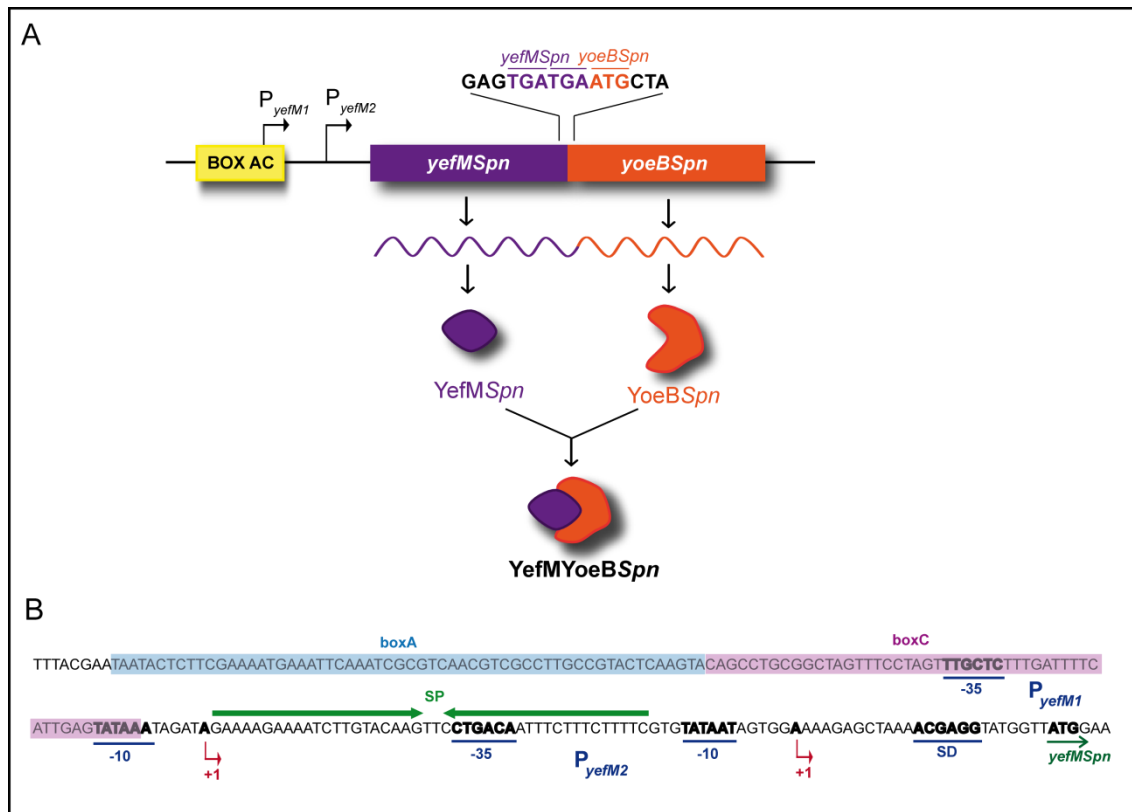


Figura 15. Organización genética del operón *yefMyoeBSpn*. (A) El locus *yefMyoeBSpn* está organizado en un operón en el cual el gen de la antitoxina *yefMSpn* precede al gen de la toxina *yoeBSpn*. Ambos genes son transcritos en un único mRNA utilizando fundamentalmente el promotor P_{yefM2} y no presentan acoplamiento traduccional entre ellos. Los codones de terminación de *yefMSpn* (TGATGA, letras en color morado) están separados del codón de iniciación de *yoeBSpn* (ATG, letras en color naranja). (B) Secuencia de nucleótidos de la región promotora del operón *yefMyoeBSpn*. Se indican en azul las secuencias -35 y -10 de los promotores P_{yefM1} y P_{yefM2} ; y el sitio de unión a ribosomas Shine-Dalgarno (SD). Los sitios de inicio de la transcripción (+1) se señalan con una flecha roja y el sitio de inicio de la traducción (ATG) con una flecha verde. El elemento BOX AC está formado por el módulo boxA (sombreado en azul) y el módulo boxC (sombreado en violeta). Las flechas verdes convergentes señalan una secuencia palindrómica (SP). (Adaptado de Chan, *et al.*, 2012).

4.2.3. PezAT

El sistema PezAT es homólogo al sistema $\epsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 de *S. pyogenes*, pero carece del tercer componente regulador de la transcripción, ω . El sistema PezAT está organizado en un operón bicistrónico, el cual está formado por el gen de la antitoxina *pezA* y el gen de la toxina *pezT* (Figura 16A). El locus *pezAT* está autoregulado ya que la antitoxina PezA actúa como un represor transcripcional y la toxina PezT como un co-represor (Khoo, *et al.*, 2007). Tanto el complejo PezAT como la antitoxina PezA se unen a una secuencia palindrómica que solapa con la región promotora del operón (Khoo, *et al.*, 2007) (Figura 16B). La antitoxina neutraliza el efecto tóxico de la toxina uniéndose a ella con una gran afinidad ($K_d = 65$ fM) (Mutschler, *et al.*, 2010), que

es de 3 a 8 veces superior a la descrita para otros sistemas TA como PhdDoc (Gazit y Sauer, 1999), RelBE (Overgaard, *et al.*, 2009) o CcdAB (Dao-Thi, *et al.*, 2005), siendo el complejo TA con mayor afinidad descrito hasta el momento.

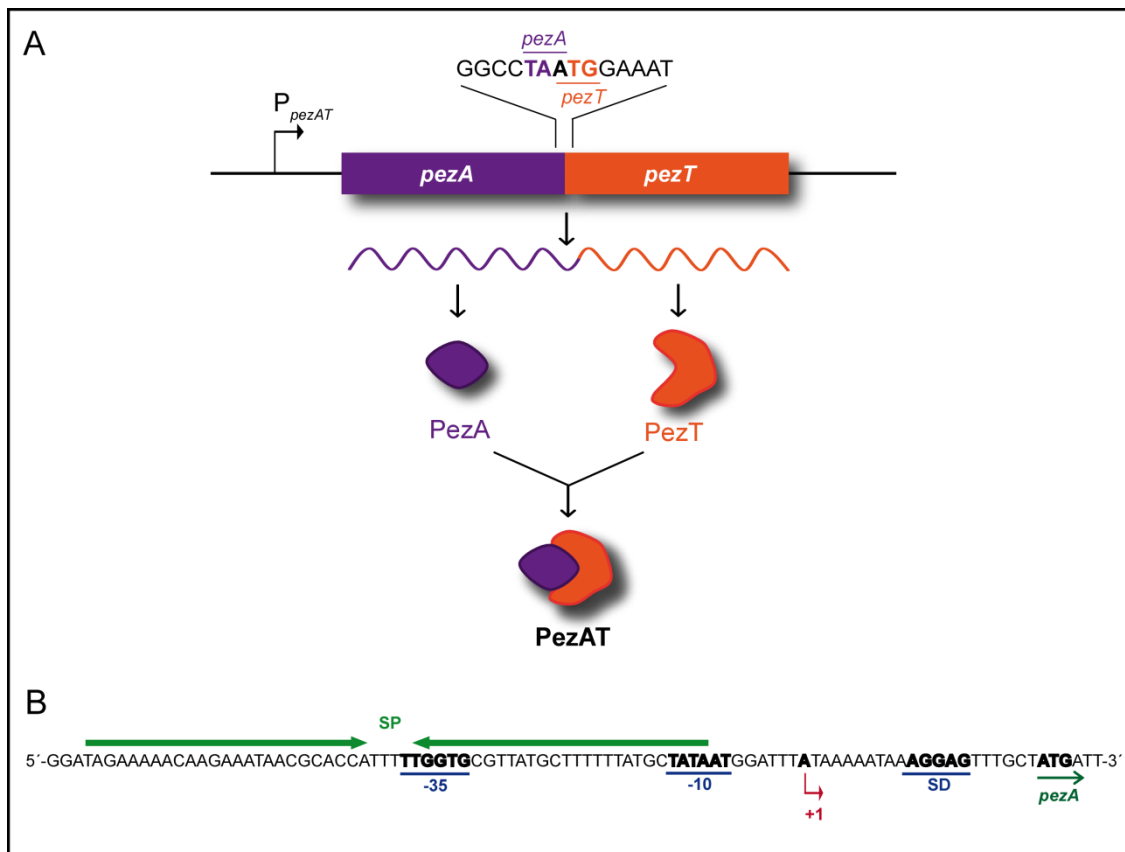


Figura 16. Organización genética del operón *pezAT* de *S. pneumoniae*. (A) El locus *pezAT* está organizado en un operón en el cual el gen de la antitoxina *pezA* precede al gen de la toxina *pezT*. Ambos genes son transcritos como un único mRNA a partir del promotor P_{pezAT} . En la parte superior se señala el posible acoplamiento traduccional de una base, el codón de terminación de *pezA* (TAA, letras en color morado) solapa con el codón de iniciación de *pezT* (ATG, letras en color naranja). (B) Secuencia de nucleótidos de la región promotora del operón *pezAT*. Se indican en azul las secuencias -35, -10 y el sitio de unión a ribosomas Shine-Dalgarno (SD). El sitio de inicio de la transcripción (+1) se señala con una flecha roja y el sitio de inicio de la traducción (ATG) con una flecha verde. Las flechas verdes convergentes señalan una secuencia palindrómica (SP). (Adaptado de Chan, *et al.*, 2012).

PezAT era, hasta el final del trabajo experimental de esta tesis, el único sistema de *S. pneumoniae* del cual se conocía su estructura tridimensional (Figura 17). El complejo PezAT forma un heterotetrámero $(PezA)_2(PezT)_2$ en el que el dímero de antitoxinas PezA está localizado entre dos monómeros de toxina PezT. De esta manera la antitoxina PezA neutraliza la toxicidad de PezT bloqueando el sitio de unión de nucleótidos (Khoo, *et al.*, 2007). El dominio N-

terminal de la antitoxina PezA adopta un plegamiento típico de un motivo HTH de unión a DNA (Khoo, *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que el sistema PezAT está implicado en la virulencia de *S. pneumoniae*. PezAT se encuentra exclusivamente en la isla de patogenicidad PPI-1 (del inglés “pneumococcal pathogenicity island 1”) en las estirpes hipervirulentas y está ausente en la PPI-1 de las estirpes no invasivas o con una virulencia intermedia (Harvey, *et al.*, 2011).

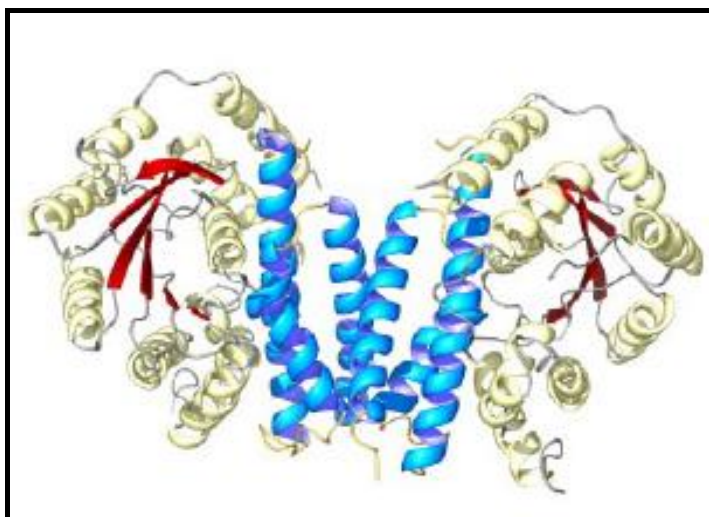


Figura 17. Estructura tridimensional del complejo PezAT de *S. pneumoniae*. El complejo PezAT forma un heterotetrámero PezT-(PezA)₂-PezT. Se representa en azul el dímero de antitoxinas PezA, en rojo las cadenas β de las toxinas PezT y en beige las hélices α de las toxinas PezT (Khoo, *et al.*, 2007).

5. RELEVANCIA DE LOS SISTEMAS TA Y SU UTILIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y MEDICINA

Considerando las características de los sistemas TA se han descrito diversas aplicaciones en el campo de la microbiología y la biotecnología, que ponen de manifiesto su relevancia, versatilidad y por lo tanto, la necesidad de continuar profundizando en el estudio de estos sistemas. En la tabla 2 se resumen algunas de las posibles aplicaciones de los sistemas TA.

Debido a: i) la presencia de sistemas TA en plásmidos que confieren resistencia a antibióticos; ii) la presencia de dichos sistemas en los cromosomas de bacterias patógenas; iii) la ausencia de sistemas TA en organismos eucarióticos, y iv) el efecto tóxico de las toxinas que conduce a la inhibición del crecimiento o incluso a la muerte bacteriana (Yamaguchi, *et al.*, 2011), se han realizado diversos estudios centrados en el diseño de nuevos antimicrobianos basados en la activación artificial de las toxinas. Asimismo, se han descrito diferentes aproximaciones para conseguir la inactivación de las antitoxinas de

forma directa o indirecta. El objetivo final, en ambos casos ha sido el intentar eliminar posibles bacterias patógenas (Williams y Hergenrother, 2012). Los sistemas TA pueden actuar como dianas antimicrobianas cuando la toxina libre actúa sobre su diana celular. Para ello se pueden utilizar compuestos capaces de inactivar directamente la antitoxina mediante la separación del complejo TA preformado o prevenir su formación (Figura 18) (Williams y Hergenrother, 2012). Los primeros ensayos que se realizaron tenían como objetivo impedir la formación del complejo PemIK de *Bacillus anthracis* (Agarwal, *et al.*, 2010). Se probaron diferentes péptidos que representaban la región C-terminal de la antitoxina PemI, encargada de interaccionar con la toxina PemK, y se observó que algunos péptidos eran capaces de separar el complejo con una considerable eficiencia pero reduciendo el efecto tóxico de PemK. Además, se ha realizado una búsqueda de péptidos que puedan separar el complejo $\epsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 de *S. pyogenes* (Lioy, *et al.*, 2010). Solamente se produjo la separación del complejo cuando se utilizó una mezcla de diferentes péptidos. Las estrategias para inactivar las antitoxinas de manera indirecta se apoyan en el hecho de que las antitoxinas son más lábiles que las correspondientes toxinas (Gerdes, *et al.*, 2005). Por un lado, se ha propuesto que una molécula que inhiba la transcripción del locus TA uniéndose al promotor, podría prevenir la producción de la antitoxina y conducir a la activación de la toxina (Williams y Hergenrother, 2012) (Figura 18). Por otro lado, la activación de las proteasas que degradan las antitoxinas, Lon y ClpP, produciría una liberación prolongada de la toxina y una degradación constante de la antitoxina que impediría la autorepresión transcripcional por parte del complejo TA (Williams y Hergenrother, 2012) (Figura 18). Se han desarrollado compuestos que activan la proteasa ClpP (Leung, *et al.*, 2011; Sass, *et al.*, 2011) pero no se ha probado su capacidad para activar las toxinas.

Los sistemas TA pueden utilizarse como herramientas para la selección de DNA recombinante y, así, se han utilizado para la construcción de vectores de selección positiva basados en la inactivación de la toxina o en reconstitución de la antitoxina. El gen de la toxina *ccdB* del sistema TA CcdAB se ha empleado para la construcción de vectores de clonaje de selección positiva por inactivación de la toxina (Bernard, *et al.*, 1994; Gabant, *et al.*, 1998). Para ello, el gen *ccdB* se fusionó con el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa en el plásmido pUC18 en un sitio de clonaje múltiple (Bernard, *et al.*, 1994). Como resultado, esta variante de CcdB fue suficientemente tóxica en ausencia de CcdA. Sin embargo, si el gen *ccdB* es inactivado por la inserción de un fragmento de DNA en el sitio de clonaje múltiple, el plásmido recombinante no puede producir CcdB y por tanto no se ve alterada la viabilidad del hospedador, permitiendo seleccionar sólo bacterias que contengan el DNA recombinante. Además, el sistema CcdAB

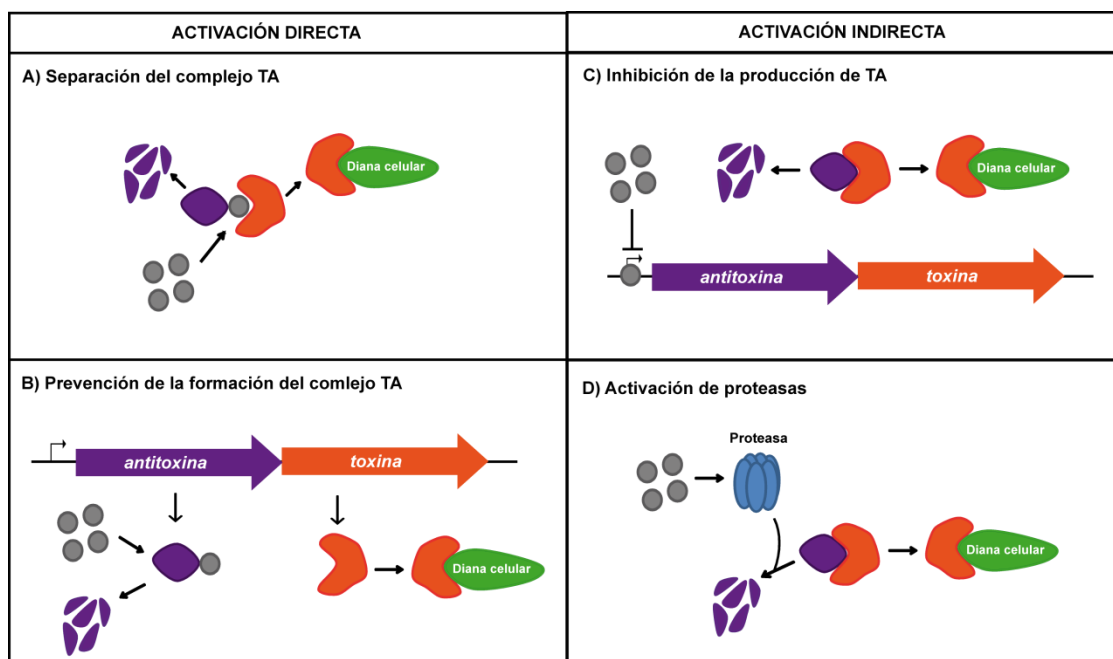


Figura 18. Posibles vías de activación de los sistemas TA para actuar como dianas de antimicrobianos. La activación directa se puede llevar a cabo con una molécula activadora (círculos grises) que produce la separación del complejo TA (A) o previene la formación del complejo TA (B). La activación indirecta se puede conseguir inhibiendo la transcripción de los genes TA (C) o activando proteasas celulares responsables de la degradación de la antitoxina (D). En color morado se representan el gen o la proteína correspondiente a la antitoxina y en naranja a la toxina y los círculos grises representan las moléculas activadoras posibles antimicrobianos. (Adaptado de Williams y Hergenrother, 2012).

también se ha utilizado para la construcción de vectores de clonaje de selección positiva basados en la reconstitución de la antitoxina. En este caso, en el vector de clonaje se clonó una versión truncada del gen de la antitoxina *ccdA* (carece de 14 pb) y el gen de la toxina *ccdB* se insertó en el cromosoma de *E. coli* bajo el control de un promotor inducible. La inserción en el vector de DNAs que incluyan en su extremo 5' la región delecionada del gen *ccdA* permite reconstituir el gen *ccdA* y de esta forma solo crecerían aquellas bacterias portadoras de vectores con una copia completa del gen *ccdA* (StabyCloning kitTM. Delphi Genetics S.A. Belgium).

Los sistemas TA se han utilizado para estabilizar plásmidos en un cultivo bacteriano. En determinadas ocasiones, como en procesos industriales de fermentación alimentaria mediada por bacterias, la adición de antibióticos para la selección de plásmidos no es apropiada, por lo que se ha propuesto sustituir en los vectores de expresión los genes de resistencia a antibióticos por sistemas TA (Kroll, *et al.*, 2010). La introducción de los sistemas Hok-Sok (Gerdes, *et al.*, 1986a) o ParDE (Roberts, *et al.*, 1993) en un vector de alto número de copias, redujo la frecuencia de células libres de plásmido en un cultivo de *E. coli* aunque sólo un 10% de las células mantenían el plásmido después de 90 h de crecimiento. Además, se ha sugerido que los sistemas TA como elementos de

estabilización plasmídica podrían proporcionar una serie de ventajas en tratamientos de terapia génica (Vandermeulen, *et al.*, 2011).

El sistema MazEF y su actividad endoribonucleasa específica de secuencia (ACA) (Zhang, *et al.*, 2003) han permitido elaborar sistemas de producción de proteínas recombinantes utilizando el sistema SPP (del inglés “*single protein production*”) (Suzuki, *et al.*, 2005). Las secuencias ACA son muy abundantes y por lo tanto MazF produce una inhibición de la síntesis de proteínas en *E. coli* (Zhang, *et al.*, 2003). La eliminación artificial de secuencias ACA en los genes de interés mediante mutagénesis dirigida y la posterior inducción de la expresión de MazF en células de *E. coli* permite obtener preparaciones enriquecidas en la proteína de interés (Suzuki, *et al.*, 2005). Esta técnica ha facilitado el marcaje de proteínas con isótopos C^{13} y N^{15} para ensayos de resonancia magnética nuclear y la producción de proteínas tóxicas.

Algunos sistemas TA son también funcionales en células eucariotas y por ello se ha evaluado su utilización para la contención de organismos modificados genéticamente. La expresión de la toxina RelE de *E. coli* inhibe el crecimiento de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Kristoffersen, *et al.*, 2000), organismo ampliamente utilizado como modelo eucariota. Este sistema TA se ha utilizado para limitar el crecimiento de células de *S. cerevisiae* y así evitar su proliferación si escapan de las condiciones de crecimiento controlado. En estas células, la expresión de la toxina está regulada por un promotor inducible por galactosa y reprimible por glucosa, mientras que la antitoxina se expresa de forma constitutiva. De esta forma, las células sólo proliferarán en medios que contengan glucosa (Kristoffersen, *et al.*, 2000).

Por otro lado, un sistema TA plasmídico como Kis-Kid del plásmido R1 de *E. coli* ha demostrado ser también funcional en células eucariotas. Así, la expresión de la toxina Kid induce la apoptosis de células eucariotas y este efecto es neutralizado por la co-expresión de la antitoxina Kis (de la Cueva Méndez, *et al.*, 2003). De esta forma, la expresión de los genes *kid* y *kis* podría utilizarse para modular la proliferación y la muerte celular en eucariotas, promoviendo una muerte celular selectiva (de la Cueva Méndez, *et al.*, 2003). Un ejemplo es la muerte de células primordiales germinales de embriones de pez cebra utilizando mRNAs de la toxina Kid y protegiendo las células somáticas con la co-expresión de la antitoxina Kis (Slanchev, *et al.*, 2005).

El sistema MazEF de *E. coli* se ha utilizado como estrategia antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y al virus de la hepatitis C. La terapia antiviral desarrollada frente al VIH consistió en la construcción de un vector en el que el gen de la toxina *mazF* se clonó *downstream* de una repetición terminal larga (LTR, del inglés “*long terminal repeat*”) del virus VIH-1, que es reconocida por la proteína Tat del VIH-1. De esta forma, tras la infección con VIH-1 de linfocitos T CD4+ portadores del gen *mazF* y LTR en el cromosoma, la proteína Tat activa la transcripción de la toxina MazF y como consecuencia se produce una degradación de mRNAs del VIH, lo que impide la replicación del

virus sin afectar al crecimiento celular (Chono, *et al.*, 2011a). Esta terapia se ha probado en monos, en los que se comprobó que la replicación del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) se suprimía tras el tratamiento con linfocitos T CD4+ portadores del gen *mazF* (Chono, *et al.*, 2011b). La terapia antiviral frente al virus de la hepatitis C se ha llevado a cabo en dos estudios independientes. Por un lado, se realizó una fusión del extremo C-terminal de la antitoxina MazE con el extremo N-terminal de la toxina MazF mediante una secuencia conectora que presenta un sitio de corte específico para la proteasa NS3, proteína esencial para la replicación del virus. La incubación con la proteasa induce un corte proteolítico que deja libre el péptido de MazF que es capaz de cortar RNA de cadena sencilla *in vitro* (Park, *et al.*, 2012b). Por otro lado, el grupo de Benhar (Shapira, *et al.*, 2012) realizó la fusión de la toxina MazF completa con un fragmento de la antitoxina MazE mediante el sitio de corte de la proteasa NS3 y observaron que la expresión de esta proteína de fusión era tolerada por células sin infectar por el virus de la hepatitis C, pero sin embargo células infectadas y células que expresaban NS3 morían.

Tabla 2. Aplicaciones de los sistemas TA.

Aplicación	Sistema TA	Descripción	Referencias
Tratamiento antimicrobiano	PemIK $\epsilon\zeta$	Activación artificial de las toxinas separando el complejo TA, impidiendo su formación, inhibiendo la transcripción de los genes TA o activando las proteasas que degradan las antitoxinas.	Agarwal, <i>et al.</i> , 2010; Lioy, <i>et al.</i> , 2010; Williams, <i>et al.</i> , 2012
Vectores de selección positiva	CcdAB	Construcción de vectores basados en la inactivación de la toxina CcdB o en reconstitución de la antitoxina CcdA.	Bernard, <i>et al.</i> , 1994
Vectores de estabilización	Hok-Sok ParDE	Utilización de sistemas TA en vectores de expresión para su estabilización.	Gerdes, <i>et al.</i> 1986a; Roberts, <i>et al.</i> 1993
Producción de proteínas recombinantes	MazEF	La expresión del gen <i>mazF</i> y del gen de interés carente de la secuencia de corte de MazF produce un alto rendimiento en la producción de la proteína de interés.	Suzuki, <i>et al.</i> 2005
Contención de organismos modificados genéticamente	RelBE	La expresión controlada de la toxina evita el crecimiento de organismos genéticamente modificados que escapan del ambiente controlado de laboratorio.	Kristofferse, <i>et al.</i> 2000
Muerte celular selectiva en organismos eucariotas	KisKid	Muerte celular selectiva debido a la expresión de la toxina Kid y a la protección del resto de células por la co-expresión de la antitoxina Kis.	de la Cueva-Mendez, <i>et al.</i> , 2003; Slanchev, <i>et al.</i> , 2005
Terapia antiviral frente a VIH y virus de la hepatitis C	MazEF	Activación de la transcripción de la toxina MazF en células humanas infectadas y consecuente degradación de mRNAs del VIH. Células humanas portadoras de la toxina y antitoxina fusionadas a un sitio específico de corte de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C, son eliminadas durante la infección debido a la activación de la toxina.	Chono, <i>et al.</i> 2011a; Shapira, <i>et al.</i> 2012; Park, <i>et al.</i> 2012b

(Adaptado de Schuster y Bertram, 2013).

OBJETIVOS

A pesar del interés que en los últimos años han suscitado los sistemas TA cromosómicos y su posible utilización como nuevas dianas de moléculas antimicrobianas, poco se conoce sobre estos elementos en bacterias G+, y concretamente en el patógeno humano *S. pneumoniae*. Considerando la utilidad de estos sistemas y aprovechando la experiencia acumulada en nuestro laboratorio en el estudio de este microorganismo, nos pareció interesante centrar el trabajo de esta tesis doctoral en el estudio del sistema TA RelBE2Spn de *S. pneumoniae*, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Caracterización estructural del complejo RelBE2Spn y de la antitoxina RelB2Spn.** En primer lugar, se emplearon técnicas de dicroísmo circular, ultracentrifugación analítica y espectrometría de masas nativa que han permitido conocer el contenido en estructura secundaria, las características hidrodinámicas, los estados de oligomerización y la estequiometría del complejo y de la antitoxina. Además, la cristalografía de rayos X ha permitido resolver la estructura tridimensional del complejo RelBE2Spn.
- 2. Caracterización funcional del complejo RelBE2Spn y de la antitoxina RelB2Spn.** Este objetivo incluye determinar la capacidad de unión a DNA de la antitoxina y del complejo, la identificación de la región operadora, definir la estequiometría de la antitoxina y del complejo TA unidos a su DNA operador, y evaluar la capacidad de la antitoxina y del complejo para actuar como elementos reguladores de la transcripción del operón *relBE2Spn*.
- 3. Estudio del papel de dos sistemas TA en la biología del pneumococo: RelBE2Spn y YefMYoeBSpn.** Para abordar este objetivo se evaluó el papel de estos dos sistemas TA de *S. pneumoniae* en la respuesta a estrés ácido y por zinc, en la capacidad de transformación, en la capacidad para formar *biofilms* y en persistencia infectiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, su genotipo, así como su procedencia, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Estirpes bacterianas.

Estirpe	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) codon-plus RIL	F ⁻ , <i>lon</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i> , an <i>E. coli</i> B strain) <i>dcm</i> , Tet ^r , <i>gal I</i> , <i>endA</i> , Hte [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>] (lisógeno λ DE3 que porta el gen de la RNA polimerasa del fago T7)	Stratagene
<i>E. coli</i> B834(DE3)	λ DE3 (<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>) F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁺</i>), <i>gal</i> , <i>met</i>	(Studier y Moffatt 1986)
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	λ DE3, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), (F ['] , <i>traD36</i> , <i>proAB⁺</i> , <i>lacI^qZΔM15</i>)	Promega
<i>S. pneumoniae</i> R61	Derivado no capsulado de la estirpe D39 (serotipo 2), aislada por S. Lacks	(Lacks, 1966)
<i>S. pneumoniae</i> D39	Serotipo 2	G. Pozzi

2. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- A549 (CCL-185, ATCC) obtenida a partir de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón.
- Huvec (C-12200, Promocell, Germany) derivada de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

3. MEDIOS DE CULTIVO

3.1. Cultivo de bacterias y selección

Para el crecimiento de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio TY (Maniatis, *et al.*, 1982). Para la selección de bacterias resistentes se utilizaron

diferentes marcadores antibióticos, que se añadieron al medio a las concentraciones indicadas: kanamicina (Km) 30 µg/ml y cloramfenicol (Cm) 30 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se añadió al medio TY bacto-agar al 1,5% y los antibióticos indicados anteriormente. Para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio SOB (Hanahan, 1983). Para la recuperación de las células bacterianas tras la transformación por electroporación se utilizó el medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa). Para la expresión de proteínas marcadas con Se-Met en la estirpe *E. coli* B834(DE3), auxótrofa para metionina, se utilizó un medio mínimo enriquecido (MME) (Tabla 4) suplementado con Km y Cm a las concentraciones anteriormente indicadas.

Tabla 4. Composición del medio mínimo enriquecido (MME).

	Concentración final	400 ml
M9 (10x)	1x	40 ml
Glucosa 40% (2,22 M)	20 mM	3.6 ml
MgSO ₄ 1M	2 mM	800 µl
FeSO ₄ (7 H ₂ O) 10 mg/ml	10 µg/ml	400 µl
CaCl ₂ 10 mg/ml	10 µg/ml	400 µl
CuSO ₄ (5H ₂ O) 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
MnCl ₂ 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
ZnCl ₂ 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
Vitaminas ^a 1mg/ml	10 µg/ml	4 ml
AA I ^b 4 mg/ml	40 µg/ml	4 ml
AA II ^c 1 mg/ml	40 µg/ml	16 ml
Metionina ó Se-Met 10 mg/ml	50 µg/ml	2 ml
Km 30 mg/ml	30 µg/ml	400 µl
Agua	-	328.28 ml

^aVitaminas: Riboflavina, piridoxina, tiamina y biotina.

^bAA I: mezcla de aminoácidos Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ile, Ser, Thr, Pro, Val.

^cAA II: mezcla de aminoácidos Phe, Tyr y Trp.

Para el crecimiento de las estirpes de *S. pneumoniae* se utilizaron diferentes medios dependiendo del tipo de ensayo. Se utilizó el medio AGCH (Lacks, *et al.*, 1986) suplementado con 0,2% de extracto de levadura y 0,3% de sacarosa (AGCH completo) y el medio C (Lacks y Hotchkiss, 1960) suplementado con 0,08% de extracto de levadura y/o 0,08% de albumina de suero bovino. El crecimiento en condiciones de *biofilm* se realizó en el medio C

sin suplementar. Las estirpes de *S. pneumoniae* que se utilizaron para la infección de líneas celulares inicialmente se crecieron en el medio Todd-Hewitt (Oxoid, Basingstoke, UK) suplementado con 1% de extracto de levadura y 1% de suero fetal bovino previamente inactivado por calor.

Para el crecimiento en medio sólido se utilizaron 2 tipos de placas: placas de medio agar-sangre (Pronadisa) y placas de medio AGCH completo; estas últimas se prepararon de forma simultánea a la siembra. La selección por resistencia a los diferentes antibióticos fue: 1,5 µg/ml Cm, 250 µg/ml Km, 100 µg/ml de estreptomycin (Sm) y 1 µg/ml de tetraciclina (Tc).

3.2. Medios de cultivo para líneas celulares

Para el cultivo de la línea celular A549 se utilizó el medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) (Gibco-Invitrogen) suplementado con 1mM de piruvato sódico, 1 g/L de D-glucosa, 2mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina a 100 µg/ml y estreptomycin a 100 µg/ml.

La línea celular Huvec se cultivo en el medio BME (medio basal de Eagle) (Gibco-Invitrogen) suplementado con 2,5% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina (Pn) a 100 µg/ml y Sm a 100 µg/ml.

En los ensayos de infección con las estirpes bacterianas se utilizaron los mismos medios, pero sin añadir los antibióticos.

4. PLÁSMIDOS

Las características más relevantes y la procedencia de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos.

Plásmido	Características	Tamaño (pb)	Marcador de selección	Referencia
pAST P _{ung}	Derivado de pLS1, contiene el promotor del gen <i>ung</i> (uracil N-glicosilasa) de <i>S. pneumoniae</i> R6	5.615	Tc ^R	(Ruiz-Cruz, <i>et al.</i> , 2010)
pMP220	Plásmido para identificar regiones promotoras fusionadas al gen <i>lacZ</i> IncP1 (RP4/RK2)	10.500	Tc ^R	(Spaink, <i>et al.</i> , 1987)
pJS3	Derivado de pLS1, contiene el gen <i>cat</i> de pC194 bajo el control del promotor P _{tet} .	4.191	Cm ^R	(Ballester, <i>et al.</i> , 1986)

pR410	Plásmido donador de transposón mariner	4.841	Ap ^R Km ^R	(Sung, <i>et al.</i> , 2001)
pET28a+	Vector de clonaje para la expresión de genes bajo el control del promotor Φ 10 del fago T7	5.369	Km ^R	Novagen
pET28relBE	pET28a:: <i>relBE2Spn</i>	5.736	Km ^R	Este trabajo
pET28relB	pET28a:: <i>relB2Spn</i>	5.579	Km ^R	Este trabajo
pMP220P _{relBE}	pMP220::P _{relBE}	10.694	Tc ^R	Este trabajo
pMP220P _{relBE} -relBE	pMP220::P _{relBE} -relBE	11.190	Tc ^R	Este trabajo
pMP220P _{relBE} -relB	pMP220::P _{relBE} -relB	10.934	Tc ^R	Este trabajo

5. OLIGONUCLEÓTIDOS

En la tabla 6 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los oligonucleótidos fueron sintetizados y purificados por HPLC en el servicio de Química de Proteínas del CIB (Sintetizador Applied Biosystems 3400). Los oligonucleótidos marcados con un asterisco fueron purificados de gel de poliacrilamida mediante el procedimiento que se describe en el apartado 3.3.2. de Métodos.

Tabla 6. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Bases
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGG	19
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
relB2NSB	GGACTAGTCGCGGATCCTTACCATTAAAAAGGGAGCAC	39
relE2CX	CCGCTCGAGATAAATATCTCTCCGATGACCAA	32
relBEHis	GGGAATTCCATATGACTACTATTACATTAAAAGTTTCTGAAGC	43
relB2BH	CGCGGATCCTTATTCATCCTTCAAGCCTAAATCAT	35
relBE-184B	CGGGATCCGAAGTGGCTCATATGACCATGG	30
relBE+120E	GGAATTCGCGAATAAGTTCCGAAAGGGAAA	30
relBE-150	CTCAAGCTGATCTGGGAGTC	20
relBE+107	GAAAGGGAAACTCCTTCAAACCTTAG	25
relBE-86	ACCATTGACAGAGATATAGAAAGAAC	26
relBE+66	GTTTTATCAGCTTCAGAACTTTTAATG	28
relBE+334	AGAAGCTAATTACAACTATTTACAAAC	28
relBE+521	ATAAATATCTCTCCGATGACCAA	23

codif-24*	CCTAAAAAGTAATACAATGGTGTACCATTAAAA	34
no codif+10*	TTTTAATGGTAACACCATTGTATTACTTTTTAGG	34
codif 30*	CCTAAAAAGTAATACAATGGTGTACCATT	30
no codif 30*	AATGGTAACACCATTGTATTACTTTTTAGG	30
relBE-184E	GGAATTGGAACCTGGCTCATATGACCATG	28
relBE+28K	CGGGGTACCCATCTTTTGTGTCCCTTTTTTAATG	34
relECK	CGGGGTACCTCAATAAATATCTCTCCGATGACC	33
relB2CK	CGGGGTACCTTATTCATCCTTCAAGCCTAAATC	33
lacZEco	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAA	24
pMP220	AAGCTTTCGCGAGCTC	16
CmF	CGGATTTTATGACCGATGATG	24
CmR	TAACGCGGCAGGTTAGTGAC	20
L-F relBE	ATGAAAAGACCTGGCAAGCTATG	23
L-R relBE	CATCATCGGTCATAAAATCCGTATAAAAAGAACACCTTCTCA GCG	45
R-F relBE	GTCACTAACCTGCCCCGTTAGGTCATCGGAGAGATATTTATT GA	44
R-R relBE	GACTTCATCTGAAACCTCACG	21
KmF	CTTATCGATACCGTCGACCTC	21
KmR	CCCCTATCTAGCGAACTTTTAG	22
L-F yefMyoeB	TTTCTTAGAACGTTTTATGCCTTC	24
L-R yefMyoeB	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCGCGATTTGAATTTGATTTTC G	43
R-F yefMyoeB	CTAAAAGTTCGCTAGATAGGGGGTCTACTGTAAAGTAGGCTT TTTC	46
R-R yefMyoeB	CTCGTCAAATTGTCGTCCTT	20
relB2P	CAGATACCGCAACACCATTGACAG	24
relE2C	CGGGATCCGAATGAAAATTTACTTGAAAAAAGT	33
Sec 1.1	CAAACCTAAGTCTACTGAAAGGTAGG	25
Sec 2.1	TGTTTTTACCTCATTTTATTGTTATTCC	28

6. ENZIMAS, PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS

Las enzimas de restricción, la ligasa y la polinucleótidoquinasa del fago T4, se adquirieron de New England Biolabs. La casa Roche suministró el kit de extracción de DNA plasmídico (*High Pure plasmid isolation kit*), la DNasa I de páncreas bovino, IPTG, inhibidor de proteasas *Complete* y dNTPs no radiactivos. La DNA polimerasa *Phusion* se adquirió de Finnzymes. Invitrogen suministró el marcador preteñido de pesos moleculares de proteínas (*SeeBlue Plus 2*) y el marcador de pesos moleculares de proteínas *Mark 12*. Bioline proporcionó el marcador de peso molecular de DNA *HyperLadder 1*. Sigma suministró las siguientes enzimas: proteinasa K, RNasa A, lisozima y seroalbúmina bovina (BSA); antibióticos: Cm, Km, Tc; además de permanganato potásico (KMnO₄), DMSO, seleniometionina, imidazol y la resina *HIS-Select Nickel Affinity Gel*. Merck suministró el etanol 100%, ácido clorhídrico, cloroformo, metanol y propanol, además de todos los aminoácidos, vitaminas y hidratos de carbono (sacarosa y glucosa). Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Pronadisa, Merck, Sigma, BD, Difco, Invitrogen y Oxoid. El marcador de peso molecular de proteínas (LMW), las columnas *Microspin G-25* y la columna *Superdex 200 XK 16/60* eran de Amersham. El kit de secuenciación de DNA se obtuvo de USB Corporation. Los nucleótidos radiactivos los suministró la empresa Hartmann. La agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, β -mercaptoetanol, SDS, Triton X-100, Commassie Bio-safe y membranas de PVDF se adquirieron de BioRad. Para la purificación de fragmentos de DNA de agarosa y limpieza de reacciones de PCR o digestiones enzimáticas se utilizó el kit *QIAquick* de Quiagen. Las membranas para diálisis se obtuvieron de Spectrum, y las diapositivas de diálisis de Pierce. Las películas de autorradiografía fueron *X-Omat S* de Kodak. Las pantallas amplificadoras empleadas fueron *Cronex Ligthingplus* de Dupont. Las placas de revelado radiactivo en el equipo *Phosphorimager (Imaging Plates)* se obtuvieron de Fuji. Los filtros de nitrocelulosa (0.22 o 0.45 μ m) para el filtrado de soluciones se adquirieron de Millipore. Las cubetas de electroporación de 2 mm de CellProjects. Los viales de concentrado de muestras de proteína Nano-sep y Micro-sep utilizados fueron de la marca Pall.

7. TAMPONES

Las soluciones y tampones utilizados en este trabajo se describen en la tabla 7. La composición de otras soluciones que sean específicas de una técnica se describirá en el apartado correspondiente del capítulo de Métodos.

Tabla 7. Tampones.

Tampón	Composición	Aplicación
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 EDTA 1mM	Disolución de DNA
TAE	Tris base 40 mM Ácido acético 20 mM EDTA 2 mM pH 8,1	Electroforesis de DNA en geles de agarosa
TBE	Tris base 89 mM Acido bórico 89 mM EDTA 2.5 mM pH 8,3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y PAA
Gel Tricina	Tris-HCl 3M SDS 0,3% pH 8,45	SDS-PAGE
T Ánodo	Tris-HCl pH 8,9 0,2 M	SDS-PAGE
T Cátodo	Tris-HCl 0,1 M Tricina 0,1 M SDS 0,1% pH 8,25	SDS-PAGE
SLB 5X	Tris-HCl 250 mM SDS 10% β -mercaptoetanol 3.5 M Glicerol 50% Azul de bromofenol 0.5% pH 7,2	Colorante de carga para SDS-PAGE
BXGE 10X	Azul de bromofenol 0.25% Xilencianol 0.25% Glicerol 60% EDTA 10 mM	Colorante de carga para electroforesis de DNA y complejos DNA-proteína
TC	Tris-HCl 20 mM Etilenglicol 5% Imidazol 10 mM β -mercaptoetanol 1 mM NaCl 500 mM pH 8,0	Tampón de muestra para la purificación de proteínas con cola de histidinas. Lavado columna de níquel utilizada para purificar por afinidad proteínas de fusión con cola de histidinas.
TEN	Tris-HCl 20 mM Etilenglicol 5% Imidazol 250 mM β -mercaptoetanol 1 mM NaCl 500 mM	Elución de proteínas retenidas por afinidad a la columna de níquel.

	pH 8,0	
TS	Tris-HCl 20 mM EDTA 1 mM Etilenglicol 5% DTT 1 mM NaCl 500 mM pH 7,6	Purificación de proteínas por filtración en gel
DC	Fosfato sódico 20 mM pH 7,2	Dicroísmo circular. Suplementado con 50 mM de NaCl para RelBE2 <i>Spn</i> y con 500 mM de NaCl para RelB2 <i>Spn</i> .
EF	Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM EDTA 2 mM pH 7,6	Elución de fragmentos de DNA de geles de PAA
EOG	Acetato magnésico 10 mM NaCl 200 mM SDS 0,1%	Elución de oligonucleótidos de geles de PAA desnaturalizantes
BXF	Formamida desionizada 80% NaOH 10 mM Azul de bromofenol 0.1 % Xilencianol 0.1% EDTA 1 mM	Colorante de carga de muestras de DNA en geles de PAA desnaturalizantes
AO	Tris-HCl 2 mM EDTA 0,2 mM NaCl 100 mM pH8	Anillamiento de oligonucleótidos
UCA	Tris-HCl 20 mM EDTA 1 mM NaCl 500 mM pH 7,6	Ultracentrifugación analítica de proteínas
UCA-DNA	Tris-HCl 20 mM EDTA 1 mM Glicerol 2% MgCl ₂ 2 mM NaCl 50 mM pH 8,0	Ultracentrifugación analítica de proteína -DNA
EMN	Acetato amónico 100 mM pH 6,7	Espectrometría de masas nativa
EQT	Acetato amónico 100 mM pH 8	ESI Q-TOF

Tampón Z	Na ₂ HPO ₄ 60 mM NaH ₂ PO ₄ 40mM KCl 10mM MgSO ₄ 10 mM β-mercaptoetanol 50 mM pH 7,0	Ensayos de actividad β-galactosidasa
PBS	KH ₂ PO ₄ 1 mM NaCl 155 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 2,9 mM pH 7,4	Lavados de células

8. SOPORTE INFORMÁTICO

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los programas informáticos que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Programas informáticos.

Programa	Dirección web / compañía	Aplicación
Blast	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Búsqueda homologías
ORF Finder	ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf	Búsqueda pautas de lectura
OligoAnalyzer	eu.idtdna.com	Análisis oligonucleótidos
Chromas	mb.mahidol.ac.th/pub/chromas	Lectura secuencias DNA
ProtParam	expasy.ch	Análisis secuencia primaria de proteínas
Porter	http://pdg.cnb.uam.es/eva	Estructura secundaria de proteínas
PsiPred	bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred	Estructura secundaria de proteínas
Jpred	compbio.dundee.ac.uk/www-jpred	Estructura secundaria de proteínas
SABLE	sable.cchmc.org	Estructura secundaria de proteínas
PredictProtein	predictprotein.org	Estructura secundaria de proteínas
PyMol	pymol.org	Visualización estructuras 3D
Selcon3 / ContinLL / CDsstr / K2d	dichroweb.cryst.bbk.ac.uk	Deconvolución espectros DC
SEDFIT	analyticalultracentrifugation.com	Velocidad de

		Sedimentación
SEDNTERP	jphilo.mailway.com	Velocidad de Sedimentación
HeteroAnalysis	biotech.uconn.edu	Equilibrio de Sedimentación
SEDPHAT	analyticalultracentrifugation.com	Equilibrio de Sedimentación
Image-reader	Fuji	Resolución de imágenes de muestras marcadas radiactivamente
QuantityOne	BioRad	Análisis de geles
SpectraManager	Jasco	Análisis dicróismo circular
MassLynx	Waters Corp.	Análisis EMN
SigmaPlot	SigmaPlot	Representación gráfica
LCS	Leica	Análisis imágenes microscopía confocal

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS

Las diferentes estirpes de *E. coli* se crecieron en medio líquido en condiciones de aireación y agitación continua a una velocidad de 150-200 rpm. En medio sólido las bacterias se sembraron en superficie.

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* se utilizaron condiciones microaerófilas utilizándose baños sin agitación y tubos cuya capacidad no sobrepasaba el doble del volumen del cultivo. Para el crecimiento en placas de AGCH-agar, las células y los antibióticos correspondientes se depositaron en dos gotas independientes en la superficie de una placa Petri, mezclándolos añadiendo una capa basal (20 ml) de medio AGCH suplementado con extracto de levadura (0,2%) y sacarosa (0,3%), al se adiciono agar al 1%. Esta capa se cubrió con 8 ml del mismo medio, sin antibióticos y con 0,75% de agar. El crecimiento en placas de agar-sangre fue en superficie.

La temperatura de incubación para el crecimiento de todas las estirpes bacterianas fue de 37°C. El crecimiento bacteriano en medio líquido se valoró midiendo la absorbancia de los cultivos a las siguientes longitudes de onda: 600 nm para *E. coli* y 650 nm para *S. pneumoniae* cuando se utiliza medio AGCH completo para su crecimiento y 550 nm cuando es el medio C el utilizado para su cultivo. Todas las medidas de absorbancia se realizaron empleando un espectrofotómetro Bausch & Lomb (Spectronic 20D+).

Para la conservación de las estirpes bacterianas, estas se crecieron hasta fase exponencial y antes de la congelación se añadió a los cultivos glicerol

(10%), se mantuvieron a 37°C durante 10 min, otros 10 min a 4°C, y finalmente se almacenaron a -80°C.

2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células de *E. coli* electrocompetentes se prepararon a partir de cultivos de la cepa de interés en medio SOC, crecidos hasta la fase exponencial ($DO_{600} = 0.5$) con agitación fuerte. Tras enfriar el cultivo en hielo, se centrifugó a baja velocidad (5.000 rpm) a 4°C y se lavó el pellet varias veces con agua fría estéril. Finalmente, las células se resuspendieron en glicerol al 10% y se congelaron en alícuotas de 50 µl a -80°C. Las células competentes de *E. coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito en (Dower, *et al.*, 1988). En todos los casos el DNA que se utilizó en la transformación estaba disuelto en agua desionizada estéril. El DNA se mezcló con 50 µl de células competentes. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación, con un ancho de ranura de 2 mm, previamente enfriada a 4°C. Para aplicar el pulso eléctrico se utilizó un electroporador Micro Pulser (BioRad), con las siguientes condiciones: 25 µF, 2.5 kV/cm y 200Ω. Las mezclas de transformación se diluyeron en 0.8 ml de medio SOC y se incubaron a 37°C en agitación (150 rpm) durante 1 hora. La selección de transformantes se realizó mediante siembra en placas con medio TY que contenían el antibiótico adecuado para la selección.

Las células pre-competentes de *S. pneumoniae* R61 se prepararon siguiendo el método descrito previamente (Lacks, 1966). Básicamente, se realizaron tres diluciones sucesivas del cultivo en medio AGCH completo cuando el cultivo alcanza la fase exponencial ($DO_{650} = 0.3$), se añadió 10% de glicerol y se congeló en alícuotas de 200 µl que se conservaron a -80°C. Para estimular la competencia, el cultivo pre-competente de R61 se diluyó en medio AGCH suplementado con 70 µM de CaCl₂ y 0.2% de sacarosa y se incubó durante 20 min a 30°C. A continuación se añadió el DNA y 25 ng del péptido estimulante de la competencia CSP-1 (del inglés "Competence Stimulating Peptide"), y la mezcla se incubó primero 40 min a 30°C, para permitir la incorporación del DNA y después la incubación se prolongó durante 90 min a 37°C para permitir la expresión fenotípica. El aislamiento de colonias transformantes se llevó a cabo mediante crecimiento en placas de AGCH-agar, como se describe en el apartado 1.

La puesta en competencia y la transformación de *S. pneumoniae* D39 se realizó por el mismo método descrito para *S. pneumoniae* R61 pero con algunas modificaciones. Una vez que el cultivo diluido en medio C, suplementado con extracto de levadura (0,08%) y albumina de suero bovino (0,08%), alcanzó una $DO_{550} = 0.2$ las células se recolectaron por centrifugación a 5K 10 min a 4°C, y se concentraron 10 veces en medio C suplementado con extracto de levadura (0,08%), albumina de suero bovino (0,08%) y 15% de glicerol. Finalmente, las células pre-competentes se congelaron a -80°C. La activación de la competencia

se realizó incubando las células durante 10 min a 37°C en medio C suplementado con albumina de suero bovino (0,08%) en presencia de 250 ng CSP-1. A continuación se añadió el DNA y la mezcla se incubó 20 min a 30°C. Para permitir la expresión fenotípica se prolongó la incubación durante 90 min a 37°C. Las mezclas de transformación se centrifugaron a 12.000 rpm 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en el mismo volumen utilizado de células activadas, de medio C suplementado con extracto de levadura (0,08%) y albúmina de suero bovino (0,08%). Para el aislamiento de colonias transformantes se utilizaron placas de agar-sangre.

3. PREPARACIONES DE DNA

3.1. Extracción de DNA

3.1.1. Extracción de DNA plasmídico

Las preparaciones de plásmido de cultivos de *E. coli* se realizaron con un kit comercial (*High Pure plasmid isolation kit*, Roche).

3.1.2. Extracción de DNA cromosómico

En general, la extracción de DNA cromosómico se realizó con el kit *bacterial genomic isolation kit* (Norgen Biotek corporation). Cuando se requería una mayor pureza de la muestra se utilizó el protocolo que se detalla a continuación. Las células recolectadas de 2 ml de cultivo crecido hasta una $DO_{650}=0,3$, se resuspendieron en 100 μ l de Tris-HCl 0,01 M pH8 y EDTA 0,02 M y esta suspensión se completó con 3 μ l de proteinasa K 20 mg/ml y 6 μ l de SDS 10% incubándose la mezcla con suave agitación (250 rpm) durante 45 min a 37°C. A continuación se añadieron 100 μ l Tris-fenol y se incubó la preparación 20 min a 20°C. La muestra se centrifugó recuperándose la fase superior, que se dializó frente a TE durante 1h utilizando filtros con un tamaño medio de poro de 3,5 kDa (Pall). Una vez finalizada la diálisis se añadió 1 μ l de RNasa A 4 mg/ml y se incubó la muestra a 37°C durante 30 min con agitación suave (250 rpm). Después de esta incubación se realizó una nueva fenolización con Tris-fenol durante 20 min a 37°C. Una vez centrifugada la mezcla se recuperó la fase acuosa a la que se añadió acetato sódico 0,3 M pH 4,8 y dos volúmenes y medio de etanol absoluto para precipitar el DNA, el DNA precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente unos minutos para después disolverlo en TE 10:1.

3.2. Obtención de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante digestión con enzimas de restricción, mediante amplificación por PCR o mediante anillamiento de oligonucleótidos.

3.2.1. Digestión con enzimas de restricción

La digestión enzimática del DNA se realizó utilizando las soluciones y condiciones de reacción recomendadas por la casa suministradora. Siempre que fue posible se hicieron digestiones dobles con enzimas cuyo tampón y temperatura de reacción fuesen compatibles, suplementando con BSA (10 µg/ml) en el caso de que alguna de ellas lo requiriera. En general, los tiempos de digestión no excedieron las tres horas y cuando fue indicado se inactivó el enzima mediante desnaturalización térmica (10 min a 65°C).

3.2.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una solución de 50-100 µl que contenía: tampón de reacción 1X (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP (Roche), 50 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de polimerasa Phusion (Finnzymes) y DNA molde. En todas las amplificaciones se utilizó un termociclador iCycler (BioRad). Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: un paso inicial a 98°C durante 30 s o 60 s dependiendo de si se utilizaba DNA plasmídico o DNA cromosómico respectivamente; seguido por 30-35 ciclos de 10 s a 98°C, 20 s a 50-56°C, y 30 s a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C.

3.2.3. Anillamiento de oligonucleótidos

El anillamiento de oligonucleótidos se realizó en tampón AO (Tabla 7), que contiene Tris-HCl 2 mM pH8, EDTA 0,2 mM y 100 mM de NaCl, con un volumen final de 50-100 µl en el que se añaden cantidades equimoleculares de ambas cadenas complementarias. La mezcla de anillamiento se incubó durante 10 min a 86°C y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a unos 37°C. Se mantuvo 45 min a 37°C y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. El oligonucleótido anillado se conservó a -80°C.

3.3. Purificación

3.3.1. Purificación de fragmentos de DNA bicatenario

Los fragmentos de DNA obtenidos por restricción o PCR se purificaron a partir de geles preparativos de agarosa al 0,8-1%, eliminando así restos de la digestión o productos inespecíficos de amplificación, respectivamente. Una vez cortada la banda de interés, el fragmento de DNA se recuperó usando un kit de extracción de gel con columnas (QIAquick de Quiagen). En los casos en que la calidad del DNA era suficiente, no fue necesaria la extracción desde gel y directamente dializaron las muestras usando las columnas del mismo kit.

Los fragmentos de DNA marcados radioactivamente en uno de los extremos 5' se purificaron a partir de geles preparativos de PAA al 5% en tampón TBE (Tabla 7). Una vez cortada la banda del gel que incluye el fragmento de DNA, éste se eluyó durante toda la noche a 42°C en tampón de elución que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM y EDTA 2 mM acrilamida. Después de la incubación la mezcla se filtró para eliminar los restos de gel de acrilamida a través de tubos *Spin-X* (Costar). Finalmente, el DNA purificado se precipitó con etanol absoluto y se disolvió en TE 10:1 o en agua desionizada.

3.3.2. Purificación de oligonucleótidos

El proceso de síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo incluye una etapa final de purificación por HPLC. No obstante, algunos oligonucleótidos (Tabla 6) fueron sometidos a una etapa posterior de purificación para eliminar de la mezcla los oligonucleótidos de tamaño inferior que se generan durante el proceso de síntesis. Esta purificación se realizó mediante la extracción desde geles de PAA según se ha descrito (Maniatis, Fritsch et al. 1982). La electroforesis se realizó en geles verticales de PAA al 15% con 8 M de urea. Las muestras se mezclaron con un volumen de formamida desionizada, se calentaron a 55°C durante 5 min y se mantuvieron en mezcla de agua y hielo hasta el momento de la aplicación en el gel. La electroforesis se realizó en tampón TBE, a un voltaje constante de 2.600 V, durante 2 horas y a una temperatura alrededor de 50°C. Tras la electroforesis, se colocó el gel encima de una placa de cromatografía fluorescente (*Fluor-coated TLC plate*, Ambion), y se irradió con luz UV de onda corta. El DNA contenido en el gel se visualizó como una serie de bandas oscuras sobre el fondo fluorescente de la placa de cromatografía. Se recortó la región del gel que contenía la banda correspondiente al oligonucleótido entero y se incubó a 42°C, toda la noche, en tampón de elución EOG (Tabla 7). El DNA eluido se separó de los restos de acrilamida por filtración con los tubos *Spin-X* (Costar), se redujo el volumen con sucesivas extracciones en 1-butanol y se precipitó con etanol absoluto. Tras la precipitación, el DNA se disolvió en tampón TE y se dializó en una columna *Microspin G-25* (Amersham Bioscience) para eliminar sales que hubieran coprecipitado con el DNA.

3.4. Ligación de DNA

En la ligación de fragmentos DNA se utilizó una relación molar entre vector e inserto de 1:5 a 1:15. En general, las condiciones de reacción fueron las recomendadas por la casa suministradora, incubando las mezclas con 20 U de ligasa del fago T4 (BioLabs), a 16°C durante 12 horas e inactivando la enzima

posteriormente 10 min a 65°C. A continuación, el DNA se precipitó con etanol absoluto y acetato sódico 0,3 M pH 4,8 y se disolvió en agua desionizada estéril.

3.5. Construcción de plásmidos recombinantes

Vector de expresión del complejo RelBE2*Spn* (pET28relBE). Las regiones del DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R61 que codifican los genes *relB2Spn* y *relE2Spn* (desde la secuencia de Shine-Dalgarno hasta el codón de terminación de *relE2Spn*) se amplificaron por PCR usando los oligonucleótidos relB2NSB y relE2CX como cebadores (Tabla 6). El fragmento de DNA de 549 pb obtenido, así como el plásmido pET28a+ fueron digeridos con SpeI y Aval y ambos productos de digestión ligados utilizando la enzima T4 DNA ligasa. De esta forma se obtuvo el plásmido recombinante pET28relBE. En esta construcción los genes de la antitoxina y la toxina se transcriben a partir del promotor $\Phi 10$ del fago T7. La expresión de estos genes permite la producción de la antitoxina RelB2*Spn* y de una toxina RelE2*Spn* portadora de una cola de 6 histidinas (His₆) en el extremo C-terminal.

Vector de expresión de la antitoxina RelB2*Spn* (pET28relB). El fragmento de PCR de 263 pb que incluye el gen *relB2Spn* (desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación de *relB2Spn*) se obtuvo a partir del DNA cromosómico de la estirpe *S. pneumoniae* R61 usando los oligonucleótidos relBEHis y relB2BH (Tabla 6). Este fragmento de DNA y el plásmido pET28a+ fueron digeridos con NdeI y BamHI y ambos productos de digestión se ligaron para así obtener el plásmido recombinante pET28relB. En esta construcción la proteína RelB2*Spn* lleva una cola de 6 histidinas (His₆) en el extremo N-terminal.

Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación automática con los oligonucleótidos T7-promoter y T7-terminator (Tabla 6).

3.6. Construcción de mutantes cromosómicos por reemplazamiento génico

Se construyeron mutantes cromosómicos de las estirpes *S. pneumoniae* R61 y *S. pneumoniae* D39 por reemplazamiento génico (Song, *et al.*, 2005). En estos mutantes los genes *relB2Spn* y *relE2Spn* o *yefMSpn* y *yoeBSpn* se sustituyeron en el cromosoma por un gen de resistencia a cloramfenicol o kanamicina, respectivamente. Se obtuvieron también dobles mutantes, sustituyendo secuencialmente los genes de ambos sistemas TA por los respectivos marcadores de resistencia.

La estrategia utilizada para la construcción de estos mutantes cromosómicos se detalla a continuación:

- ***S. pneumoniae* Δ relBE**: Se amplificó por PCR el gen *cat* de resistencia a cloramfenicol (1.048 pb) utilizando como DNA molde el plásmido pJS3 y los oligos CmF y CmR como cebadores. Por otro lado, las parejas de oligos L-FrelBE (L-F) / L-RrelBE (L-R) así como R-FrelBE (R-F) / R-RrelBE (R-R) se utilizaron para amplificar las regiones flanqueantes izquierda y derecha, respectivamente, de los genes *relB* y *relE*, generando productos de PCR de 611 pb y 607 pb.

Los oligos utilizados en estas amplificaciones tienen las siguientes características:

El oligonucleótido L-RrelBE (L-R) contiene secuencias complementarias a:

- La región promotora del operón *relBE*
- La región 5' del gen *cat*

El oligonucleótido R-FrelBE (R-F) por su parte contiene secuencias complementarias a:

- La región 3' de *relE2Spn*
- La región 3' del gen *cat*

Los oligos L-F y R-R incluyen secuencias complementarias a las regiones 5' y 3' cromosómicas que flanquean el operón *relBE2Spn*.

Una mezcla con cantidades equimoleculares de los tres fragmentos (1.048, 611 y 607 pb) se utilizó como molde en una reacción de PCR en la que se emplearon los oligos L-FrelBE y R-RrelBE como cebadores. El producto de esta amplificación contendría el gen *cat* delimitado a izquierda y derecha respectivamente por las regiones flanqueantes de los genes *relB* y *relE* (Figura 19).

- ***S. pneumoniae* Δ yefMyoeB**: Se realizó el mismo protocolo que para el mutante *S. pneumoniae* Δ relBE pero sustituyendo el operón *yefMyoeB* por un gen de resistencia a kanamicina (*kan*). En este caso, se amplificó por PCR el gen *kan* (1.053 pb) utilizando como DNA molde el plásmido pR410 y como cebadores los oligonucleótidos KmF y KmR. Los oligonucleótidos L-FyefMyoeB (L-F) y L-RyefMyoeB (L-R), y R-FyefMyoeB (R-F) y R-RyefMyoeB (R-R) se utilizaron para amplificar las regiones flanqueantes izquierda y derecha, respectivamente, de los genes *yefM* y *yeoB*, generando productos de PCR de 581 pb y 583 pb. De nuevo los tres fragmentos de PCR se mezclaron para usarlos como molde para obtener un fragmento de fusión que se utilizó para transformar *S. pneumoniae*.

Los productos obtenidos en ambas construcciones se utilizaron para transformar *S. pneumoniae* R61 y D39 y mediante recombinación homóloga se introdujeron en el cromosoma bacteriano (Figura 19).

Para la construcción del doble mutante se transformó el mutante *S. pneumoniae* Δ relBE con el producto de PCR que contiene el gen de resistencia a kanamicina, este marcador de resistencia sustituye en el cromosoma a los genes *yefM* y *yoeB*.

Las mutaciones cromosómicas se verificaron por secuenciación de un fragmento de PCR generado a partir del DNA genómico utilizando como cebadores los oligonucleótidos L-F y R-R. Se confirmó en todas las estirpes la delección de los genes cromosómicos y la incorporación del casete de resistencia, utilizando los pares de oligonucleótidos relB2P y relE2c, y Sec 1.1 y Sec 2.1.

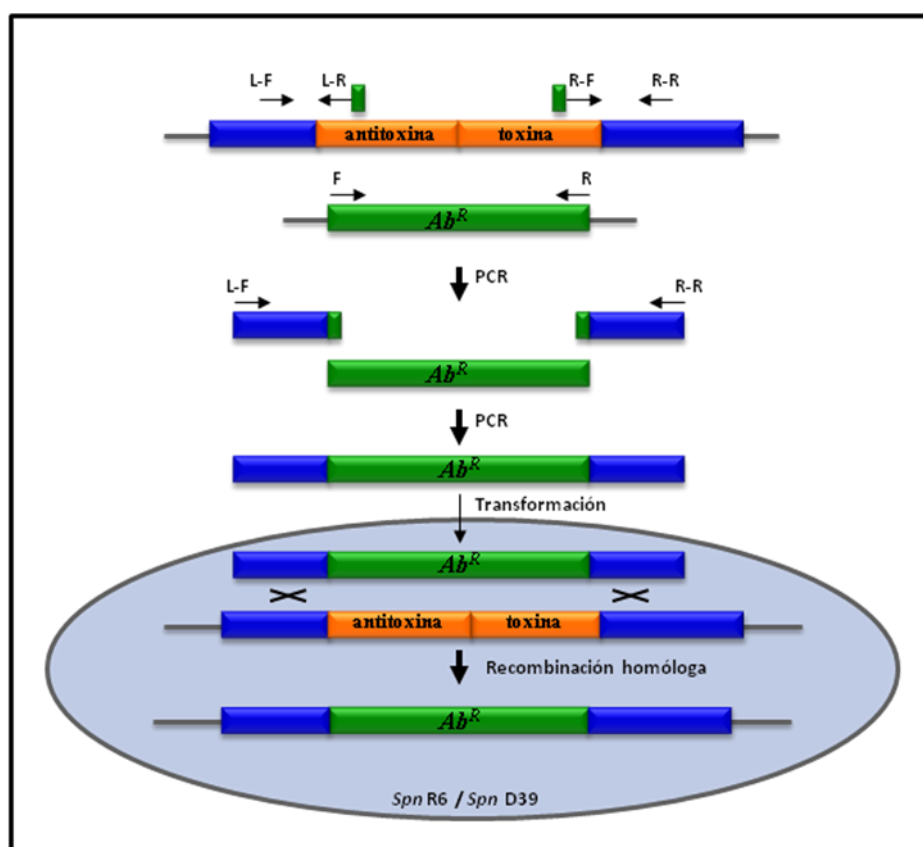


Figura 19. Esquema de la construcción de mutantes cromosómicos de estirpes de pneumococos mediante reemplazamiento génico.

4. ANÁLISIS DE DNA

4.1. Cuantificación

La concentración de las muestras de DNA se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm, estimando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 μ g/ml de DNA de cadena doble. En algunos casos, la cuantificación de dsDNA lineal se determinó por densitometría mediante electroforesis en geles de agarosa o PAA teñidos con bromuro de etidio (BrEt),

comparando las intensidades de la(s) banda(s) de DNA de interés y un patrón de fragmentos de DNA de concentración y peso molecular conocido (*HyperLadder I*, Bioline).

4.2. Electroforesis

4.2.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales con una concentración de agarosa de 0,8-1%. Para la aplicación en el gel, se añadió a las muestras tampón de carga BXGE 1X. La electroforesis se realizó utilizando los tampones TAE o TBE, a voltaje constante y a temperatura ambiente. Condiciones como la duración de carrera, el voltaje aplicado y la longitud del gel, dependieron de las características del DNA a analizar. Para la tinción del DNA se sumergieron los geles en BrEt a una concentración de 0,5-1 µg/ml, durante 30 min a temperatura ambiente. En determinadas ocasiones fue necesaria la tinción del DNA durante la electroforesis, para lo cual se incluyó BrEt en el gel y en el tampón de carrera. El DNA se visualizó con luz ultravioleta de onda corta (260 nm) en un transiluminador *GelDocXR* (BioRad), la imagen resultante se capturó con el software *QuantityOne* (BioRad).

4.2.2. Electroforesis en geles de PAA

4.2.2.1. Geles PAA nativos. La electroforesis de fragmentos de DNA en geles nativos de PAA se realizó en geles verticales con el sistema *Mini Protean-II* (BioRad). La concentración de PAA fue de 5% en tampón TBE. Los geles se sometieron a una pre-electroforesis durante al menos 30 min, a un voltaje de 100 V y a una temperatura de 4°C. La carrera se realizó en las mismas condiciones durante el tiempo requerido según el tamaño de los DNAs a analizar. Antes de la aplicación en el gel, las muestras se mezclaron con tampón de carga BXGE. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron y visualizaron como se indica en el punto anterior.

Cuando los fragmentos de DNA que se separaron en la electroforesis estaban marcados radiactivamente, su detección se realizó mediante exposición autoradiográfica y posterior revelado de películas *XOmat* (Kodak) o mediante análisis de *Phosphorimager* (Fuji).

4.2.2.2. Geles PAA desnaturalizantes. La purificación de oligonucleótidos se realizó mediante electroforesis en geles verticales de PAA al 15% con 8 M de urea en tampón TBE. Los geles fueron sometidos a voltaje constante de 2.600 V, 2 horas de duración y a una temperatura alrededor de 50°C. Por otro lado, los productos de las reacciones de corte con DNasa I y radical hidroxilo o las reacciones de secuenciación, se sometieron a

electroforesis en geles de PAA al 8% con 7M de urea y en tampón TBE. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%, NaOH 10 mM), se calentaron a 80°C durante 3 min y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la aplicación en el gel. En todos los casos se llevó a cabo una pre-electroforesis durante 30 min en las mismas condiciones de carrera. Las bandas radiactivas se visualizaron por exposición autorradiográfica y revelado de pantallas *XOmat* (Kodak), o mediante el sistema *Phosphorimager* (Fuji).

4.3. Secuenciación

4.3.1. Secuenciación manual

Para la secuenciación manual del DNA se siguió una variación del método de secuenciación química de Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980). El DNA diana marcado con (γ -P³²)-ATP en uno de sus extremos 5', se incubó con 1 μ l de ácido fórmico 0,2 M y 1 μ l de tRNA 1 mg/ml durante 30 segundos a 65 °C. La reacción se paró por adición de 30 μ l de acetato sódico 1,5 M pH 7 y 150 μ l de etanol absoluto. Las muestras se precipitaron dos veces con etanol absoluto a -80°C durante 10 minutos y posteriormente se disolvieron en 50 μ l de agua destilada y 5 μ l de piperidina 10 M. Las preparaciones se incubaron a 100°C durante 10 minutos, a continuación se añadió 1 ml de 1-butanol y se centrifugó la mezcla 10 minutos. El precipitado así obtenido se resuspendió en 50 μ l SDS 1% y 500 μ l de 1-butanol, la suspensión se centrifugó 10 minutos y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 80%.

El producto así obtenido se disolvió en tampón de carga (formamida desionizada al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%) y se aplicó en geles de PAA al 8% con 7 M de urea. El producto de la reacción se separó mediante electroforesis en TBE a 50 W durante 2 h 30 minutos. Los resultados se visualizaron mediante exposición autorradiográfica y revelado de pantallas *XOmat* (Kodak), o mediante el sistema *Phosphorimager* (Fuji).

4.3.2. Secuenciación automática

La comprobación de la secuencia de las diferentes construcciones obtenidas durante el desarrollo de este trabajo fue realizada por el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB (Secugen).

4.4. Marcaje radiactivo de DNA

4.4.1. Marcaje de oligonucleótidos en el extremo 5'

El marcaje de oligonucleótidos en el extremo 5' se realizó siguiendo el método descrito (Maniatis, *et al.*, 1982), utilizando la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (New England Biolabs) y (γ -P³²)-ATP (3.000 Ci/mmol) (Hartmann). La reacción de fosforilación se incubó 1 h a 37°C y se inactivó a 65°C durante 20 minutos. El (γ -P³²)-ATP no incorporado se eliminó por filtración en gel con las columnas *Micro-Spin* G25 (Amersham Bioscience).

4.4.2. Marcaje de fragmentos de DNA por PCR

Para la obtención de un fragmento de DNA marcado radiactivamente en uno de los extremos 5', la reacción de PCR se realizó siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.2.2., y añadiendo cantidades equimoleculares de cada uno de los oligonucleótidos, uno marcado radiactivamente en el extremo 5' y el otro oligonucleótido sin marcar. Los fragmentos de DNA así obtenidos se purificaron según se indica en el apartado 3.3.1.

5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los plásmidos recombinantes que se utilizaron para sobreproducir el complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y la antitoxina His₆RelB2*Spn* en *E. coli* se construyeron en base al vector de expresión pET28a+. En este vector, el gen clonado se expresa bajo el control del promotor Φ 10 del fago T7, empleando la estirpe *E. coli* BL21(DE3) codon-plus RIL o, en el caso de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* con Se-Met, la estirpe auxótrofa para metionina *E. coli* B834(DE3). En este sistema la expresión del gen clonado se encuentra regulada por el represor Lac (codificado en el plásmido pET). Esta proteína reguladora se une a la región operadora del promotor *lacUV5* e impide la transcripción del gen de la T7-RNAP (localizado en el lisógeno de λ DE3 integrado en el cromosoma de *E.coli*). La adición de IPTG al medio de cultivo inactiva el represor Lac, permitiendo la síntesis de la T7-RNAP, la cual reconoce el promotor Φ 10 del fago T7 y transcribe el gen diana clonado en el vector pET.

5.1. Purificación de RelBE2*Spn* y RelB2*Spn*

Las proteínas RelB2*Spn* y RelE2His₆*Spn* se purificaron como un complejo de ambas proteínas a partir de la estirpe *E. coli* BL21(DE3) codon-plus RIL que contiene el plásmido pET28relBE. Se diluyó un cultivo crecido durante la noche en medio TY suplementado con Km y Cm y se incubó a 37°C con fuerte agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀=0,5 se indujo la expresión del gen clonado bajo el control del promotor Φ 10, por la adición de 0,7 mM IPTG durante 30 min a 30°C. Transcurrido este período de incubación se añadió al cultivo rifampicina (200 μ g/ml) (para inactivar la RNA polimerasa bacteriana) y

se continuó la incubación a 37°C durante otros 90 min. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con Tris 20 mM pH 7,6 y a continuación el sedimento celular se concentró 100 veces en tampón TC suplementado con pastillas de inhibidores de proteasas libres de EDTA (*Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche). La lisis celular se realizó pasando dos veces la suspensión celular por una prensa French utilizando una presión de 8,3 MPa. El lisado celular se centrifugó durante 30 min a 9.500 rpm y a 4°C y el sobrenadante se aplicó a una columna cargada con 7 ml de resina de níquel (*His-select Nickel Affinity Gel*, Sigma). La columna se lavó con tampón TC y el complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn, fijado a la columna de níquel, se eluyó de la columna con tampón TEN. Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas durante la elución mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de PAA con SDS (SDS-PAGE) y posterior tinción de los geles con *Coomassie Brilliant blue* R-250 (Bio-Rad). Las fracciones enriquecidas en el complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn se juntaron para su posterior diálisis frente al tampón TS. La muestra dializada se cargó en una columna de filtración en gel (Superdex 200 XK16/60, Amersham Biotech). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenían las proteínas RelB2Spn-RelE2His₆Spn se juntaron y concentraron por filtración en filtros *Microsep* (Pall) con un tamaño medio de poro de 3 kDa. La preparación de proteína se repartió en alícuotas que se congelaron a -80°C para su conservación y posterior utilización.

La antitoxina His₆RelB2Spn se purificó siguiendo el mismo protocolo pero usando cultivos de la estirpe *E. coli* BL21(DE3) codon-plus RIL que contiene el plásmido pET28relB.

5.2. Purificación de RelBE2Spn con Selenio-Metionina

La producción del complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn con Se-Met se llevó a cabo partiendo de un preinóculo de la estirpe *E. coli* B834(DE3) con el plásmido pET28relBE. Se inocularon 400 ml de medio mínimo enriquecido (MME; Tabla 4) y se incubó a 37°C con fuerte agitación hasta que alcanzó una DO₆₀₀= 0,8. Se centrifugaron las células durante 20 min a 3.500 rpm y a 4°C y se resuspendió el sedimento celular en el mismo volumen de MME sin metionina, incubando a 37°C y 200 rpm durante 30 min para agotar la metionina intracelular. Transcurrido este tiempo, los 400 ml de cultivo se diluyeron en 3,6 litros de MME suplementado con Se-Met a una concentración final de 50 µg/ml. Cuando se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,8-1, se indujo la sobreproducción de la proteína mediante la adición de IPTG (1 mM), incubando en las mismas condiciones durante 2 horas. Se recogieron las células por centrifugación y se prosiguió con el protocolo empleado para las proteínas RelB2Spn-RelE2His₆Spn (apartado 5.1). Debido a la toxicidad de la Se-Met, se trabajó en una campana de extracción durante todo el proceso de manipulación de los cultivos.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Cuantificación

El análisis del espectro de absorción de las diferentes preparaciones de proteínas, entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm, empleando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, permitió, conociendo el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) específico de cada proteína, determinar la concentración y la calidad de las proteínas purificadas.

6.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de PAA

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles discontinuos desnaturalizantes de PAA con SDS (SDS-PAGE). El gel concentrador se preparó con PAA al 4% en 0,375 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,3% de SDS. El gel separador se preparó con una concentración de PAA al 16% en 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 y 0,3% de SDS. En ambos casos se usaron TEMED y PSA como catalizadores de la polimerización. Los geles se montaron en cubetas *Mini-Protean II* (BioRad). Antes de la aplicación, se añadió a las muestras tampón de carga SLB 1X (véase Tabla X) y a continuación se desnaturalizaron calentando 95°C durante 5 min. Para la electroforesis se utilizaron dos tampones diferentes, el tampón ánodo y el tampón cátodo (Tabla 7). Tras la aplicación de las muestras, se inició la electroforesis con un voltaje constante de 80 V hasta que las muestras entraron en el gel separador, y luego continuó con un voltaje de 180 V durante un tiempo que dependía de la masa molecular de las proteínas a analizar. Las proteínas fueron detectadas tiñendo los geles con *Coomassie Brilliant blue R-250* (Bio-Rad).

6.3. Secuenciación del extremo N-terminal

La secuencia amino-terminal de las proteínas se determinó en el Servicio de Química de Proteínas del CIB, aplicando degradación secuencial de Edman (Edman y Begg, 1967) en un secuenciador Procise 494 (Applied Biosystems). El procesamiento previo de las muestras consistió en separar las muestras en geles SDS-PAGE, junto con un marcador de proteínas preteñido (*SeeBlue Plus 2*, Invitrogen) para transferirlas posteriormente a membranas PVDF mediante el sistema *Mini Trans-Blot* (BioRad). A continuación, dicha membrana se sometió a tinción con *Coomassie Brilliant blue R-250* (Bio-Rad), y tras desteñir y lavar con H_2O , se secó a temperatura ambiente para recortar las bandas de interés y proceder al análisis.

6.4. Análisis de la composición de aminoácidos

Para la determinación de la composición de aminoácidos, se utilizaron 12 μg de RelB2*Spn*-RelE2His6*Spn* en el tampón TS (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM,

etilenglicol 5%, DTT 1 mM, NaCl 500 mM, pH 7,6). El análisis se realizó en el Servicio de Química de Proteínas del CIB, utilizando un analizador BIOCHROM 30.

6.5. Inmunodetección de proteínas

6.5.1. Preparación de anticuerpos policlonales de conejo frente al complejo proteico RelB2Spn

Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a RelB2Spn se inyectaron en el conejo, vía intravenosa, varias dosis del complejo proteico RelB2Spn-RelE2His₆Spn. En la primera dosis se inyectaron 200 µg del complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn en una emulsión con adyuvante completo de Freund (Sigma) y se realizaron tres refuerzos, cada tres semanas, con la misma cantidad de proteína en una emulsión con adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Después del segundo y tercer refuerzo se sacó sangre al conejo y el suero inmune se obtuvo mediante centrifugación de las muestras durante 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C. La manipulación del conejo se llevo a cabo en el Servicio de Animalario del CIB. La capacidad del suero inmune para reconocer las proteínas RelB2Spn y RelE2Spn se determinó mediante ensayos de *western blot*.

6.5.2. Ensayo de *western-blot*

Las proteínas, una vez separadas por SDS-PAGE, se electro-transfirieron a membranas PVDF. La transferencia se realizó durante 1 h 30 minutos a 60 V y a 4°C en el sistema *Mini Trans-Blot* (BioRad). En los ensayos de *western blot* se utilizaron como anticuerpos primarios: i) anticuerpos monoclonales anti polihistidinas (*Monoclonal Anti-polyHistidine Clone HIS-1 Mouse Ascites Fluid*. Sigma), o ii) anticuerpos policlonales frente al complejo RelB2Spn. Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se incubaron con el tampón de saturación (PBS 1X, Tween20 al 0,05% y caseína al 0,2%) y el anticuerpo primario durante toda la noche con agitación suave y a temperatura ambiente. Tras la incubación, las membranas se lavaron con PBS 1X y Tween20 al 0,05%. Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos marcados con peroxidasa anti-ratón (GE Healthcare) o anti-conejo (Sigma). La unión con el anticuerpo secundario se realizó incubando las membranas durante 1 h con agitación suave y a temperatura ambiente. Tras el lavado de las membranas con PBS 1X y Tween20 al 0,05%, los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron por quimioluminiscencia con el kit *Immun-Start HPR Chemiluminescent kit* (Bio-Rad) y un detector acoplado a una cámara CCD (LAS-3000, Fuji).

6.6. Ultracentrifugación analítica

Esta técnica se llevó a cabo en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares del CIB. Ensayos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación permitieron la determinación de la masa molecular y de las propiedades hidrodinámicas del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn*, en presencia o en ausencia de un fragmento de DNA de 30 pb, y de la antitoxina His₆RelB2*Spn*. Los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica *Optima XL-I* (Beckman-Coulter), equipada con una óptica para la región UV y visible, usando un rotor AnTi50 y celdas de centrífuga de paso óptico de 12 mm. Las medidas de absorbancia fueron tomadas a una apropiada longitud de onda entre 229 y 296 nm.

6.6.1. Velocidad de sedimentación

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* (10 μ M, 25 μ M y 50 μ M) y His₆RelB2*Spn* (8,75 μ M, 21,8 μ M y 32,8 μ M) en tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM y NaCl 500 mM, pH 7,6. En aquellos ensayos, donde se analizaron los complejos DNA-proteína las muestras contenían un fragmento de DNA de 30 pb a 1 μ M o mezclas de este DNA con concentraciones crecientes de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* (0,5 μ M, 1 μ M y 5 μ M) en tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 2%, MgCl₂ 2 mM y NaCl 50 mM, pH 8,0. Los experimentos se realizaron a 48.000 rpm y a una temperatura de 20°C. Para calcular los coeficientes de sedimentación de las diferentes muestras analizadas, se realizó un análisis $ls-g^*(s)$ (del inglés "least squares $g^*(s)$ boundary analysis") de la distribución del coeficiente de sedimentación. Este método se basa en el análisis de los datos por mínimos cuadrados, y el término $g^*(s)$ indica que se trata de la distribución del coeficiente de sedimentación aparente ya que no se ha tenido en cuenta la difusión. El análisis de los perfiles de sedimentación por este método se realizó utilizando el programa SEDFIT. El coeficiente de sedimentación se corrigió para las condiciones estándar usando el programa SEDNTERP, con lo que se obtuvo el correspondiente valor de $S_{20,w}$. El valor del coeficiente de fricción traslacional de RelB2*Spn* y RelBE2*Spn* (f) se determinó a partir de la masa molecular y del coeficiente de sedimentación de la proteína, mientras que el coeficiente de fricción de la esfera hidratada equivalente (f_0) se estimó usando una hidratación de 0,4506 g de agua por g de proteína. Con estos valores se pudo calcular la relación de fricción traslacional (f/f_0), que proporcionó una estimación sobre la forma de la proteína.

6.6.2. Equilibrio de sedimentación

Para los ensayos de equilibrio de sedimentación se utilizaron las mismas concentraciones de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn*, en ausencia o en presencia de DNA, y de His₆RelB2*Spn* que en el apartado anterior. Las muestras fueron centrifugadas a diferentes velocidades (15.000, 18.000 y 21.000 rpm) y a una

temperatura de 20°C. Las lecturas de absorbancia se realizaron en intervalos de 3 h para determinar que las muestras habían alcanzado el equilibrio. En todos los casos, la señal de línea base fue adquirida después de la centrifugación a alta velocidad (48.000 rpm). El cálculo de la masa molecular aparente ($M_{w,a}$) se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo de una sola especie o a un modelo de varias especies utilizando el programa SEDPHAT.

6.7. Espectrometría de masas

6.7.1. MALDI-TOF

Para el análisis de masa molecular de la antitoxina His₆RelB2*Spn*, el complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* con Se-Met se utilizó el espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF (del inglés "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight") Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) del Servicio de Proteómica del CIB, equipado con un láser de haz fino. Previamente las muestras de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* se dializaron en un tampón que contenía 20 mM de Tris-HCl pH 7,6 y 50 mM de NaCl, mientras que la muestra de His₆RelB2*Spn* se dializó en 20 mM de Tris-HCl pH 8 y 100 mM de NaCl. Los espectros fueron adquiridos en un rango de 2.000 a 20.000 Da, utilizando una fuerza del láser justo por encima del umbral de ionización. Las muestras fueron analizadas en modo positivo (detección de iones cargados positivamente) y en modo de extracción lineal retrasado. En cada espectro de masas simple se sumaron 1.000 disparos de láser. Se realizó una calibración externa utilizando insulina y citocromo C (Sigma).

6.7.2. ESI Q-TOF

El análisis de masa molecular de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* también se realizó utilizando un espectrómetro de masas ESI Q-TOF (del inglés "ElectroSpray Ionisation Quadrupole-Time-Of-Flight") SYNAPT HDMS (Waters, Manchester, UK) en la Unidad de Proteómica de la Universidad del País Vasco. Los experimentos se realizaron en tampón EQT (Tabla 7). La muestra fue inyectada en el espectrómetro de masas por infusión directa. Los datos fueron adquiridos en un rango de masas entre 7.000-75.000 Da. Los espectros de masas se procesaron con el programa MassLynx.

6.7.3. Espectrometría de masas nativa (EMN)

Los ensayos de espectrometría de masas nativa se llevaron a cabo con el complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y la antitoxina His₆RelB2*Spn*, ambas en presencia o en ausencia de un fragmento de DNA de 30 pb. Previamente todas las muestras se dializaron en tampón EMN (Tabla 7). La concentración de la muestra dependió de la proteína a analizar, así se utilizó RelBE2*Spn* 20 µM, RelB2*Spn* 10 µM y las relaciones molares proteína:DNA siguientes: RelBE2*Spn*:DNA 10:1 (RelBE2*Spn* 10 µM), RelB2*Spn*:DNA 5:1 (RelB2*Spn* 10

μM) y RelB2*Spn*:DNA 20:1 (RelB2*Spn* 20 μM). Este trabajo se realizó en colaboración con los Dres. R. Díaz-Orejas y E. Diago (CIB) y con los Dres A. J. Heck y A. Barendregt (Universidad de Utrecht). Se utilizó un espectrómetro de masas ESI-TOF (del inglés "ElectroSpray Ionization orthogonal Time-Of-Flight"), equipado con una fuente de ionización nano-electrospray (*Z-spray*) (Micromass LC-T, Waters, Manchester, UK) modificado para operar con altas masas y en modo positivo (detección de moléculas cargadas positivamente) (van den Heuvel 2006). Para preparar los capilares, de 5 μm de orificio, se utilizó cristal de borosilicato (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) y un estirador P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA). Los capilares fueron cubiertos con una fina capa de oro ($\sim 500 \text{ \AA}$) utilizando el instrumento *Edwards ScanCoat Six Pirani 501 sputter coater* (Edwards High Vacuum International, Crawley, UK). Para generar iones intactos de las proteínas en solución, se aplicó una presión interna en las primeras fases de vacío de 7 mbar para enfriar los iones. El electrospray se inició aplicando un voltaje eléctrico de 1200-1300 V en los capilares y de 70-80 V en el cono. Todos los espectros obtenidos fueron calibrados utilizando una solución acuosa de yoduro de cesio (25 mg/ml). Los datos fueron analizados utilizando el programa MassLynx.

6.8. Predicción de estructura secundaria de proteínas

La predicción del contenido y distribución de estructuras secundarias en base a la secuencia de aminoácidos de las proteínas RelB2*Spn* y RelE2*Spn* se llevó a cabo con diferentes programas bioinformáticos, tales como Porter, PsiPred, Jpred, SABLE y PredictProtein. Con el resultado obtenido con cada uno de los análisis, se calculó el contenido medio de los residuos implicados en hélice- α , cadena- β o que forman parte de regiones no repetitivas (giro β) o regiones desordenadas.

6.9. Análisis de dicroísmo circular

6.9.1. Determinación del espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y la antitoxina His₆RelB2*Spn* se adquirió con un espectropolarímetro JASCO J-720 equipado con un controlador de temperatura tipo *peltier*. Las proteínas purificadas se equilibraron por diálisis en el tampón DC (Tabla 7) suplementado con 50 mM de NaCl para RelE2*Spn* y con 500 mM de NaCl para RelB2*Spn*, se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm y a 4°C para eliminar el material insoluble, y se diluyeron en el mismo tampón DC a una concentración de 40 μM RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y 20 μM His₆RelB2*Spn*. Para la adquisición del espectro en el UV lejano se emplearon cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,2 mm, en un rango de longitud de onda de 185 a 260 nm y a temperaturas de 0°C y 30°C. Cada espectro fue el resultado de cuatro acumulaciones, a una

velocidad de barrido de 10 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y una respuesta de 4 s. Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo ($\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$), tras la sustracción del espectro del tampón, según la expresión:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \Theta \times \text{Mmrw} / 10 \times c \times l$$

donde $[\Theta]_{\text{MRW}}$ es la elipticidad media en grados por residuo promedio, Θ es la elipticidad en miligrados, Mmrw es la media del peso molecular por residuo (calculado como el cociente entre el peso molecular y el número de residuos de la proteína), c es la concentración de la proteína en mg/ml y l es el paso óptico en cm. La elipticidad molar calculada se representó frente a la longitud de onda. Para obtener información estructural, se analizaron los datos de dicroísmo circular en el UV lejano con cuatro programas diferentes: Selcon3, que incorpora un método auto-consistente junto con un algoritmo de descomposición de valores únicos para asignar estructuras secundarias de proteínas (Sreerama, *et al.*, 1999); ContinLL, que implementa el algoritmo de regresión *ridge* de Provencher y Glockner (Provencher y Glockner, 1981); CDsstr (Johnson, 1999) y K2d (Andrade, *et al.*, 1993), que son métodos para el análisis de espectros de DC mediante el uso de redes neurales.

6.9.2. Análisis de la estabilidad térmica

Mediante dicroísmo circular también se analizaron los cambios inducidos en la estructura secundaria de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y la antitoxina His₆RelB2*Spn* por el incremento de temperatura desde 0°C hasta 80°C. Las muestras de proteína se diluyeron en tampón DC indicado en el apartado anterior, hasta una concentración de 12 μM de RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* y 20 μM de His₆RelB2*Spn*. Los cambios en la elipticidad se registraron a una longitud de onda de 220 nm, en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Además, se recogieron espectros en un rango de 200 a 260 nm de longitud de onda y un rango de temperatura de 10°C a 80°C, con incrementos de temperatura de 5°C o 10°C. En todos los casos, la temperatura se equilibró durante 1 min antes de adquirir el espectro. Finalmente, el incremento de temperatura se revirtió y se recogieron espectros en un rango de temperatura de 80°C a 10°C en las mismas condiciones anteriores. El análisis de los espectros se llevó a cabo con el programa SpectraManager (Jasco).

7. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA

7.1. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

Los fragmentos de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de la antitoxina His₆RelB2*Spn* o del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn*. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 20 minutos en tampón de unión (Tris-HCl 20 mM pH8, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% y MgCl₂ 2 mM) en presencia de distintas concentraciones de NaCl (50 mM, 100 mM y 150 mM) y de competidor, heparina (5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 50 µg/ml) (Mayne Pharma) o Poli(dl-dC) (50 ng y 100 ng) (Amersham). La formación de los complejos se analizó mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 5% en tampón TBE (Tabla 7) y a una temperatura de 4°C, en las mismas condiciones que se indican en el apartado 4.2.2. Los complejos se visualizaron mediante tinción del gel en una solución con bromuro de etidio a 0,5 µg/ml y su posterior exposición a luz ultravioleta en un transiluminador GelDocXR (BioRad). Si el DNA estaba marcado radiactivamente los productos se detectaron mediante exposición autoradiográfica o mediante el sistema *Phosphorimager* (Fuji).

7.2. Ensayos de *footprinting*

7.2.1. Ensayos de *footprinting* con DNasa I

El fragmento de DNA marcado con (γ-P³²)-ATP (1,8 nM) en un de sus extremos 5' fue incubado con distintas cantidades del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* o la proteína His₆RelB2*Spn* en el tampón de incubación de la enzima DNasa I (Roche) (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 10 mM), suplementado con DTT 1 mM, glicerol al 10%, NaCl 100 mM y heparina 10 µg/ml o Poli(dl-dC) 50 ng, a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada reacción se trató con 0,04 U de DNasa I (*Recombinant DNaseI*, *RNase-free*, Roche) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se pararon añadiendo 25 µl de solución *stop* (acetato amónico 2 M, EDTA 0,15 M, acetato sódico 0,8 M pH 7, tRNA 400 µg/ml) y fueron precipitadas con etanol absoluto a -80 °C durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se disolvieron en el tampón de carga (formamida desionizada al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%), se calentaron 3 minutos a 80°C y se analizaron en geles de PAA al 8% con 7 M de urea junto a la reacciones de secuenciación del fragmento obtenidas por el método de Maxam y Gilbert. Las reacciones de *footprinting* fueron detectadas por autoradiografía, las imágenes se capturaron con un densitómetro calibrado GS-800 y se analizaron utilizando el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

7.2.2. Ensayos de *footprinting* con radical hidroxilo

Se mezclaron distintas cantidades del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ o la proteína (His)₆RelB2Spn con el fragmento de DNA marcado con (γ -P³²)-ATP (3,6 nM), en NaCl 100mM y heparina 10 μ g/ml o Poli(dI-dC) 50ng y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones de *footprinting* se iniciaron con la adición de 9 μ l de la mezcla reactiva (Fe(II)-EDTA 10x, H₂O₂ 10x, Na-Ascorbato 10x) y después de 7 minutos a temperatura ambiente se pararon las reacciones añadiendo 14,7 μ l de solución *stop* (Tiourea 0,041 M, NaAc 1,5 M pH6, tRNA 0,68 mg/ml). Las muestras fueron precipitadas con etanol absoluto a -80 °C durante 30 minutos y resuspendidas en el tampón de carga (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%, NaOH 10 mM). Previamente a la electroforesis las muestras se calentaron 3 minutos a 80°C y se analizaron en geles de PAA al 8% con 7 M de urea junto a la reacción de secuenciación por el método de Maxam y Gilbert del mismo fragmento. Las reacciones de *footprinting* fueron detectadas por autoradiografía, las imágenes se capturaron con un densitómetro calibrado GS-800 y se analizaron utilizando el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

8. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X DEL COMPLEJO RelBE2Spn

La cristalización y la resolución de la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X del complejo RelBE2Spn fueron realizadas por el grupo del Prof. Miquel Coll, del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB).

Se obtuvieron cristales incubando muestras del complejo RelBE2Spn purificado con o sin Se-Met (14 mg/ml o 16 mg/ml, respectivamente) (apartados 5.1 y 5.2 de Métodos) en presencia de 39% de 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD); imidazol 0,05 M pH 7,0 y acetato magnésico 0,04 M. Tras la difracción por rayos X de los cristales se procedió al procesamiento de los datos. La estructura del complejo RelBE2Spn con Se-Met fue resuelta por el método de difracción anómala múltiple (MAD, del inglés “Multiple-wavelength Anomalous Diffraction”). Una vez resuelta esta estructura se resolvió la estructura del complejo RelBE2Spn nativo por el método de reemplazo molecular (utilizando como modelo estructural la estructura de RelBE2Spn con Se-Met) (MR, del inglés “Molecular Replacement”). Los programas informáticos empleados para identificar los átomos de selenio y obtener los mapas de densidad electrónica fueron SHELXD (Usón y Sheldrick, 1999; Sheldrick, *et al.*, 2001; Schneider y Sheldrick, 2002), AutoRickshaw (Panjikar, *et al.*, 2005; Panjikar, *et al.*, 2009) y MLPHARE (Babu, *et al.*, 1988). Las fases iniciales se mejoraron mediante los programas PIRATE (Cowtan, 2006) y RESOLVE (Terwilliger, 2000; Terwilliger, 2003). Los modelos iniciales se refinaron con REFMAC (Murshudov, *et al.*, 1997) y se inspeccionaron y corrigieron manualmente utilizando el programa COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Para resolver la estructura nativa a partir de la estructura de RelBE2Spn con Se-Met por reemplazo molecular, se utilizó el

programa MOLREP (Vagin y Teplyakov, 1997). El refinado y la inspección/corrección manual se hicieron con los programas REFMAC (Murshudov, *et al.*, 1997) y COOT (Emsley y Cowtan, 2004), respectivamente.

9. ENSAYOS *in vivo*

9.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa

Se construyeron una colección de plásmidos que contienen diferentes regiones del operón *relBE2Spn* fusionadas transcripcionalmente con el gen *lacZ*, que codifica el enzima β -galactosidasa. Los ensayos de regulación transcripcional se realizaron tanto en *cis*, con los dos elementos reguladores (secuencia operadora y genes *relB2Spn* o *relBE2Spn*) clonados en el mismo plásmido, como en *trans*, en los que cada elemento se encuentra localizado en plásmidos diferentes. Los plásmidos utilizados en estos ensayos se describen detalladamente a continuación.

I. Ensayos de regulación transcripcional en *cis*

- **pMP220 P_{relBE}**: contiene la región promotora-operadora del operón *relBE2Spn*. Este plásmido se construyó clonando en el plásmido pNM220 (Tabla 5) un fragmento de PCR de 210 pb amplificado utilizando como molde el DNA cromosómico de la estirpe *S. pneumoniae* R61 y utilizando como cebadores los oligonucleótidos relBE-184E y relBE+28K.
- **pMP220 P_{relBE}-relBE**: contiene la región promotora-operadora del operón *relBE2Spn* y los genes *relB2Spn* y *relE2Spn*. El fragmento clonado en el plásmido pMP220 de 706 pb, se obtuvo por amplificación de un fragmento de DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R61 utilizando los oligonucleótidos relBE-184E y relECK.
- **pMP220 P_{relBE}-relB**: contiene la región promotora-operadora del operón *relBE2Spn* y el gen *relB2Spn* en un fragmento de DNA de 450 pb, que se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando como molde DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R61 y como cebadores los oligonucleótidos relBE-184E y relB2CK.

Tanto los productos de amplificación como el plásmido PMP220 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI y se ligaron utilizando T4 DNA ligasa. Los diferentes plásmidos recombinantes se utilizaron para transformar *E. coli* JM109 (DE3). Como control en los experimentos se utilizó el plásmido pMP220.

II. Ensayos de regulación transcripcional en *trans*

Para proporcionar el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ o la antitoxina His₆RelB2*Spn* en *trans*, se transformó la estirpe *E. coli* JM109 (DE3) que contiene el plásmido pMP220 P_{relBE}, con los plásmidos pET28relBE, pET28relB (apartado 3.5.) y pET28 (Tabla 5).

Todos los cultivos se crecieron a 37°C en medio TY hasta alcanzar la fase exponencial. La expresión en *trans* de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ o His₆RelB2*Spn*, se indujo añadiendo a los cultivos 1 mM de IPTG e incubando a 30°C durante 30 min y 1 hora. Además, como control, se crecieron los mismos cultivos sin inducir con IPTG. A continuación se añadió tampón Z (Tabla 7) y o-nitrofenil-β-Dgalactopiranosido (ONPG) a las células previamente permeabilizadas con SDS y cloroformo. Tras incubación con ONPG (1 a 4 min), la reacción se paró añadiendo Na₂CO₃. La actividad β-galactosidasa se determinó en unidades Miller (Miller 1972), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = (\text{DO}_{420} - 1.75 \times \text{DO}_{550} / T \times V \times \text{DO}_{600}) \times 1000$$

donde *T* es el tiempo de reacción en min y *V* es el volumen de cultivo utilizado en ml. Las medidas de densidad óptica se llevaron a cabo en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific) utilizando placas *EIA/RIA flat bottom plate without lid, 96 wells* (Corning). Se realizaron cuatro experimentos independientes con cada cultivo y los valores de actividad β-galactosidasa se se midieron por triplicado, con estas medidas se calculó el valor medio y la desviación estándar.

9.2. Crecimiento y análisis morfológico de *S. pneumoniae* en diferentes medios de cultivo

9.2.1. Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento a 37°C de las estirpes *S. pneumoniae* R61 y D39 silvestres y los mutantes ΔrelBE2*Spn*, ΔyefMyoeB*Spn* y ΔrelBE2*Spn*ΔyefMyoeB*Spn* en el medio C y en el medio C suplementado con 0,08% de extracto de levadura. Las medidas de DO₆₃₀ se llevaron a cabo en un incubador de placas Multiskan Ascent (Thermo Scientific) y en placas *Microtest tissue culture plate* (Becton Dickinson) Se obtuvieron tres valores independientes de cada cultivo y se calculó el valor medio y la desviación estándar.

9.2.2. Morfología celular

Para observar la morfología celular de *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes ΔrelBE2*Spn*, ΔyefMyoeB*Spn* y ΔrelBE2*Spn*ΔyefMyoeB*Spn* se crecieron en medio AGCH a 37°C hasta alcanzar una DO₆₅₀ = 0,6 y se visualizaron en un microscopio de contraste de fases (Axioplan Universal, Zeiss).

9.2.3. Morfología de colonias

La morfología de las colonias de *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes $\Delta\text{relBE2Spn}$, $\Delta\text{yefMyoeBSpn}$ y $\Delta\text{relBE2Spn}\Delta\text{yefMyoeBSpn}$ se analizó creciendo los cultivos en placas de agar-sangre (Pronadisa) e incubando las placas a 37°C durante 6 días.

9.2.4. Crecimiento en condiciones de estrés ácido

S. pneumoniae R61 silvestre y el doble mutante $\Delta\text{relBE2Spn}\Delta\text{yefMyoeBSpn}$ se crecieron a 37°C en medio AGCH hasta alcanzar una $\text{DO}_{650} = 0,3$. Se añadió ácido clorhídrico a 0,5 N hasta disminuir el pH del medio hasta 6 y 5. El crecimiento se siguió midiendo la DO_{650} en un espectrofotómetro Bausch & Lomb (Spectronic 20D+).

9.2.5. Crecimiento en condiciones de estrés por alta concentración de zinc

S. pneumoniae R61 silvestre y el doble mutante $\Delta\text{relBE2Spn}\Delta\text{yefMyoeBSpn}$ se crecieron a 37°C en medio AGCH completo y en AGCH completo suplementado con 0,2 mM, 0,5 mM o 1 mM de ZnSO_4 . El crecimiento se valoró midiendo la DO_{650} del cultivo durante 150 minutos utilizando un espectrofotómetro Bausch & Lomb (Spectronic 20D+).

9.3. Cálculo de la frecuencia de transformación

Para calcular la frecuencia de transformación de *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes $\Delta\text{relBE2Spn}$, $\Delta\text{yefMyoeBSpn}$ y $\Delta\text{relBE2Spn}\Delta\text{yefMyoeBSpn}$, se transformaron los cultivos competentes de cada una de las estirpes con 500 ng de DNA cromosómico que porta, entre otros, un marcador Sm^R , de fácil selección en *S. pneumoniae* (DNA cromosómico [RF46SKNE sul-a sul-d SmR KmR NovR EmR]). La selección de transformantes se realizó con 100 µg/ml de estreptomicina. La frecuencia de transformación se calculó siguiendo la fórmula:

$$V_T = (\text{N}^\circ \text{ transformantes} / \text{N}^\circ \text{ viables}) \times 100$$

9.4. Crecimiento en condiciones de *biofilm*

Las estirpes bacterianas se crecieron en medio C (Lacks y Hotchkiss, 1960) hasta alcanzar una $\text{DO}_{550} = 0,4-0,5$. Una cantidad de células equivalente a una $\text{DO}_{550} = 0,6$ se centrifugó a temperatura ambiente 2 min a 12.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de medio C y se realizaron diluciones seriadas de cada muestra. Se dispensaron 200 µl/pocillo de cada dilución en placas de poliestireno de 96 pocillos (*Costar 3595 96-well PST microtiter plates*,

Corning). Las muestras se incubaron 34°C o 37°C durante 6h y se determinó el crecimiento bacteriano mediante medida de absorbancia a 595 nm. El *biofilm* formado en estas condiciones se valoró mediante tinción utilizando cristal violeta al 0,2% e incubando de las muestras 15 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron sucesivos lavados con agua desionizada para eliminar las bacterias no adheridas, y el *biofilm* se solubilizó con etanol absoluto. Para cuantificar la formación de *biofilm* se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas *Anthos 2020 microplate absorbance reader* (Anthos Labtec Instruments). Se realizaron siete experimentos independientes y cada uno de ellos por triplicado. Se calculó el valor medio y la desviación estándar de los datos obtenidos y se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t-Student.

Para la observación de los *biofilms* por microscopía láser confocal espectral (CLSM, del inglés "Confocal Laser Scanning Microscopy"), los cultivos bacterianos se crecieron siguiendo el protocolo descrito anteriormente pero cada dilución se dispensó en placas con el fondo de cristal de 22 mm de diámetro *Glass-bottomed WillCo-dish* (WillCo Wells). Tras la incubación a 34°C durante 5 h, el *biofilm* formado se tiñó utilizando el kit de viabilidad celular *LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit* (Invitrogen). Este kit utiliza dos colorantes para ácidos nucleicos, el compuesto fluorescente verde, SYTO 9 y yoduro de propidio (IP) que es un compuesto fluorescente rojo. Estos colorantes difieren en su capacidad de penetración en células bacterianas vivas. El SYTO 9 marca tanto células vivas como muertas, mientras que el IP solo penetra en células con la membrana dañada. Así, las células vivas emiten fluorescencia verde, mientras que las células que tienen comprometida su viabilidad emiten fluorescencia roja. Los *biofilms* se observaron con un aumento x63 utilizando un microscopio TCS-SP2-AOBS-UV (Leica). Las imágenes se analizaron con el programa LCS. Se realizaron reconstrucciones tridimensionales sobre el plano x-y (adquisición de secciones cada 0,5 µm) y el plano x-z (adquisición de secciones cada 3 µm).

9.5. Ensayos de persistencia infectiva

9.5.1. Cultivo y conservación de líneas celulares

Los cultivos de células eucariotas con 5% del crioprotector DMSO se conservaron en tanques con nitrógeno líquido. Para realizar el primer subcultivo se descongelaron los viales conservados en nitrógeno líquido en un baño de agua a 37°C, se añadió medio suplementado con penicilina y estreptomicina precalentado a 37°C y la mezcla se dispensó en placas *Cell culture dish 100* (TPP) con 15 ml del medio. Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Las células se examinaron cada 24 horas con un microscopio de contraste de fases invertido para determinar la integridad de las células, el grado de confluencia y la presencia de posibles contaminantes.

Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia alrededor del 80% (aproximadamente 3 días), se realizaron subcultivos para prevenir la muerte celular. Ambas líneas celulares utilizadas en este trabajo crecen formando una monocapa adheridas a la superficie del soporte. Para obtener una suspensión celular se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió tripsina-EDTA (Promocell, *Germany*), que permite levantar las células de la superficie de la placa y romper las uniones célula-célula, incubándose las células con esta solución durante 5 min a 37°C. La suspensión celular se lavó con medio suplementado con suero fetal bovino, para bloquear la actividad de la tripsina, las células una vez lavadas, se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo y se procedió al recuento de las células/ml utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de fases invertido. Se transfirió el número de células requerido a una nueva placa de cultivo con medio precalentado y se incubó a 37°C y 5% CO₂.

9.5.2. Ensayos de infección

Para realizar los ensayos de infección las células se cultivaron como se indica en el apartado anterior, pero una vez tratadas con tripsina-EDTA y realizado el recuento se dispensó la cantidad requerida ($0,7 \times 10^5$ células / pocillo o $0,4 \times 10^5$ células / pocillo) en placas de 24 pocillos (*Tissue culture test plates 24*, TPP). En los casos en los que posteriormente las células se visualizarían por microscopía de fluorescencia, se colocó en los pocillos un disco de cristal al que se adhirieron las células. En todos los casos, las células se incubaron en el medio sin suplementar con antibióticos, a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas.

Por otro lado, las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y el doble mutante Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn portadoras del plásmido pAST P_{ung}, se crecieron a 37°C en medio Todd Hewitt suplementado con 1% de extracto de levadura y 1% de suero fetal bovino inactivado por calor, hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,4. En este punto los cultivos bacterianos se lavaron con PBS, se concentraron hasta $2,5 \times 10^9$ células/ml (DO₆₀₀ = 1,4) y se realizaron las diluciones necesarias en el medio DMEM o BME sin antibióticos para obtener distintas multiplicidades de infección (MOI, del inglés "Multiplicity of Infection"). Se emplearon MOIs bacterias:células de 50:1, 20:1, 10:1 y 5:1.

A las células humanas incubadas durante 24 horas se les retiró el medio y se añadió 500 µl de cada dilución bacteriana. Así, las células humanas y las bacterias se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 2 horas y 4 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, las muestras se fijaron con 2% de paraformaldehído 20 min a temperatura ambiente, y se conservaron a 4 °C.

9.5.3. Ensayo de invasión mediante recuento de bacterias viables en las células infectadas

Las células humanas infectadas con *S. pneumoniae* R61 silvestre y el doble mutante $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$, utilizando MOIs de 50:1, 20:1, 10:1 y 5:1, se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Transcurrido este periodo de incubación, se eliminaron las bacterias extracelulares añadiendo a los cultivos gentamicina (Gn) (100 µg/ml), Pn (100 µg/ml) y Sm (100 µg/ml) y se continuó la incubación en presencia de los antibióticos durante 2 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se añadió agua estéril a las placas de cultivo para lisar las células. El recuento de bacterias intracelulares (determinación de unidades formadoras de colonias, cfu) se realizó mediante la siembra de diluciones seriadas de los lisados celulares en placas de agar-sangre. El sobrenadante de la infección también se sembró en placas de agar-sangre para confirmar la eficacia del tratamiento antibiótico. Se realizaron cuatro experimentos independientes utilizando tres réplicas de cada MOI.

9.5.4. Ensayos de invasión mediante doble inmunofluorescencia

Se realizó la infección de las células humanas con *S. pneumoniae* R61 silvestre y el doble mutante $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ utilizando MOIs de 50:1, 20:1, 10:1 y 5:1 e incubando los cultivos a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Transcurrido este periodo de incubación, se eliminaron las bacterias extracelulares añadiendo a los cultivos Gn (100 µg/ml), Pn (100 µg/ml) y Sm (100 µg/ml) y se continuó la incubación en presencia de los antibióticos durante 2 horas. A continuación, las muestras se fijaron con 2% de paraformaldehído 20 min a temperatura ambiente y se conservaron a 4°C durante 24h. Se retiró el paraformaldehído y las muestras se incubaron con 10% de suero fetal bovino durante 1 hora a temperatura ambiente. Para inmuno-localizar las bacterias extracelulares se incubaron las preparaciones 45 min a temperatura ambiente con un anticuerpo de conejo frente a la proteína A de *S. pneumoniae* (1:100 en 10% suero fetal bovino) (Pineda, Germany). A continuación, se añadió un anticuerpo secundario frente a inmunoglobulina G de conejo marcado con AlexaFluor488 (verde) (Invitrogen) (1:200 en 10% suero fetal bovino) y se incubó durante 30 min en oscuridad. Después de cada paso se realizaron lavados con PBS. Finalizada esta segunda incubación se lisaron las células con tritón X-100 y se inmuno-localizaron las bacterias intracelulares utilizando un protocolo similar que el utilizado para inmuno-localizar las bacterias extracelulares pero utilizando como anticuerpo secundario un anticuerpo frente a inmunoglobulina G de conejo marcado con AlexaFluor568 (rojo) (Invitrogen) (1:300 en 10% suero fetal bovino). Finalmente, las muestras se incubaron con *fluoroshield*-DAPI (Sigma) para teñir de azul los ácidos nucleicos y se observaron mediante microscopía de fluorescencia.

9.5.5. Microscopía de fluorescencia

Las muestras correspondientes a los ensayos de infección se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia *Axiovert 25* (Zeiss). Las preparaciones antes de su observación al microscopio de fluorescencia se incubaron con *fluoroshield*-DAPI (Sigma) y/o con AlexaFluor568-Faloidina (Invitrogen) para teñir de azul los ácidos nucleicos y de rojo la actina, respectivamente. Las bacterias se observan en verde por ser portadoras del plásmido pAST P_{ung} que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente verde GFP (del inglés "Green Fluorescence Protein"). En los experimentos de doble inmunofluorescencia (ver apartado 9.4.4) se utilizaron estirpes bacterianas que no portaban el plásmido pAST P_{ung}, y por ello, la inmunolocalización de las células bacterianas se realizó utilizando anticuerpos secundarios que marcan de forma diferencial las bacterias extracelulares, AlexaFluor488 (verde) y las intracelulares AlexaFluor568 (rojo). Además, en estas preparaciones, se utilizó *fluoroshield*-DAPI (Sigma) para teñir de azul los ácidos nucleicos.

9.5.6. Análisis por citometría de flujo

Las muestras procedentes de las infecciones fijadas con 2% paraformaldehído se resuspendieron en medio DMEM o BME sin antibióticos y se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) utilizando la técnica FACS (del inglés "Fluorescence-Activated Cell Sorting"). Como controles se utilizaron una muestra que contiene sólo la estirpe bacteriana *S. pneumoniae* R61 silvestre y una muestra de células sin infectar.

RESULTADOS

**CAPÍTULO 1: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO ReIBE2*Spn* Y DE LA
ANTITOXINA ReIB2*Spn***

En este capítulo se detallan las estrategias experimentales que han permitido la sobreproducción y purificación del complejo RelBE2*Spn* y la antitoxina RelB2*Spn*. Las preparaciones obtenidas, con un alto grado de pureza, han sido utilizadas para realizar la caracterización estructural de estas proteínas utilizando diversas técnicas como el dicroísmo circular (DC), ultracentrifugación analítica (UA) o espectrometría de masas nativa (EMN). Los resultados de DC han proporcionado información sobre la estructura secundaria de la antitoxina y de su complejo con la toxina, mientras que la UA aporta información sobre las características hidrodinámicas y el grado de asociación de las muestras. Además, se han determinado los estados de oligomerización y la estequiometría de la antitoxina y del complejo mediante EMN. Estos últimos experimentos fueron realizados por la Dra. Elizabeth Diago-Navarro y el Dr. Ramón Díaz-Orejas en colaboración con el grupo del Dr. Albert Heck, jefe del grupo *Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics* de *Bijvoet Center for Biomolecular Research* y *Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences*, Utrecht, Holanda.

Además, en colaboración con el Prof. M. Coll, se ha resuelto la estructura tridimensional del complejo RelBE2*Spn* por cristalografía de rayos X. La cristalización y la resolución de la estructura fueron llevadas a cabo por el grupo del Prof. Miquel Coll, del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB).

1.1. SOBREPDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ Y DE LA ANTITOXINA (His)₆RelB2*Spn* EN *E. coli*

Sobreproducción

En general en los sistemas TA, el gen de la antitoxina y de la toxina se encuentran agrupados en un operón que asegura la co-expresión de ambos genes, ya que la expresión independiente de la toxina y, más aún, su sobreproducción, es tóxica para las células (Gotfredsen y Gerdes, 1998; Gerdes, *et al.*, 2005; Nieto, *et al.*, 2006). Por esta razón, las toxinas suelen co-expresarse con su correspondiente antitoxina. Atendiendo a estas características, los genes de la antitoxina y toxina *relB2Spn* y *relE2Spn* se expresaron conjuntamente en *E. coli* utilizando el plásmido pET28relBE. Para la sobreproducción de la antitoxina RelB2*Spn* se utilizó el plásmido pET28relB (Materiales y Métodos). Se indujo la expresión de los genes de la antitoxina y la toxina en células de *E. coli*, portadoras del plásmido pET28relBE, mediante la adición de IPTG al medio de cultivo. Se analizaron por SDS-PAGE muestras de los cultivos obtenidas antes y después de la inducción con IPTG (Figura 20). En las muestras correspondientes a extractos de *E. coli* inducidos para la síntesis del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ se observaron dos bandas que no se detectaron en las muestras

sin inducir. Una de las proteínas presentaba una movilidad electroforética aparente que correspondería a un tamaño de 9.000 Da, el cual coincide con el tamaño teórico estimado a partir de la secuencia de nucleótidos para la antitoxina RelB2*Spn* (9.205 Da, Tabla 10). La otra banda correspondería a una proteína que tendría una movilidad electroforética que se aproximaría a un tamaño de aproximadamente 20.000 Da (Figura 20A), que no coincidiría con el tamaño estimado para la toxina RelE2(His)₆*Spn* de 11.505 Da. Por otro lado, en las muestras de extractos bacterianos que sólo expresan la antitoxina y bajo condiciones de inducción, sólo se observó la sobreproducción de una proteína cuya migración coincidió con la esperada para la antitoxina (His)₆RelB2*Spn* (11.368 Da, Tabla 10) (Figura 20B).

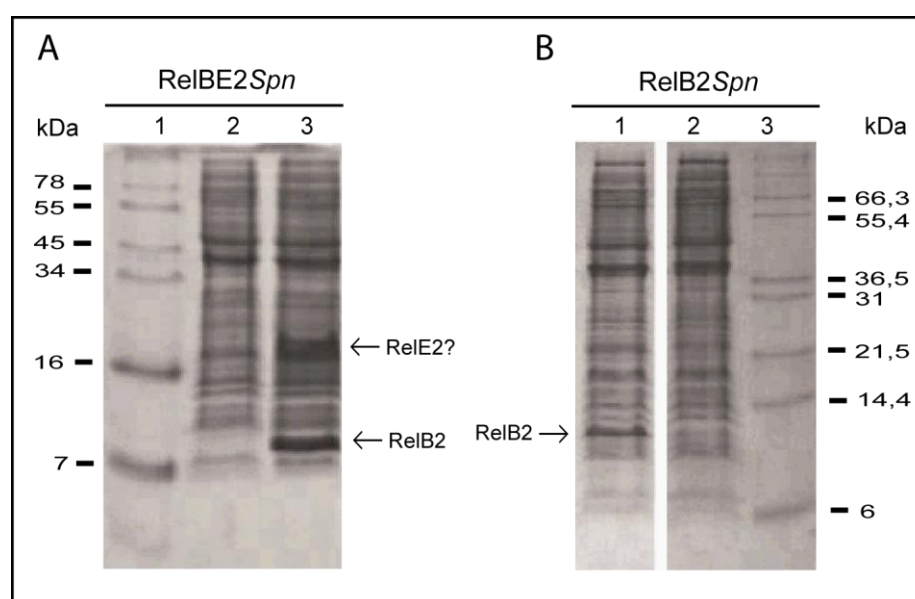


Figura 20. Inducción de la síntesis de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ y (His)₆RelB2*Spn*. (A) Inducción de la síntesis de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ en *E. coli* BL21(DE3) codon plus-RIL portadora del plásmido pET28relBE. 1. Marcador de peso molecular *SeeBlue Plus*. 2. Muestra recogida antes de la inducción. 3. Muestra recogida tras la inducción con IPTG (0,7 mM) e incubación a 30°C durante 2 h. (B) Inducción de la síntesis de (His)₆RelB2*Spn* en *E. coli* BL21(DE3) codon plus-RIL conteniendo el plásmido pET28relB. 1. Muestra recogida tras la inducción con IPTG (0,7 mM) e incubación a 30°C durante 2 h. 2. Muestra recogida antes de la inducción. 3. Marcador de peso molecular *Mark12*. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las proteínas sobreproducidas.

Además, se intentaron purificar por separado la antitoxina y la toxina a partir de extractos de células en las que se había sobreproducido el complejo RelBE2*Spn*. Para ello, las proteínas del extracto retenidas en la columna de níquel se desnaturalizaron con hidrocloreuro de guanidina 5 M o con urea 8 M para así, al eluir, obtener la toxina y la antitoxina en fracciones separadas. Dializadas las fracciones para eliminar la urea y replegadas las proteínas, se

conseguirían preparaciones enriquecidas en RelE2*Spn* o en RelB2*Spn*. Estas preparaciones se sometieron a una nueva etapa de purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, en los ensayos realizados no conseguimos obtener muestras de cada una de las proteínas por separado que tuvieran un grado de purificación aceptable.

Para confirmar la identidad de las proteínas producidas en los cultivos de *E. coli* portadores de los genes antitoxina-toxina o solamente la antitoxina (His)₆RelB2*Spn* se emplearon dos aproximaciones experimentales: ensayos de *western blot* y determinación de la secuencia de aminoácidos por secuenciación de los extremos N-terminales.

Ensayos de *western blot*

En estos ensayos se utilizaron como anticuerpos primarios dos preparaciones diferentes: policlonales de conejo, obtenidos frente al complejo RelBE2*Spn* (Figura 21A) y monoclonales de ratón (comerciales) que reconocen una secuencia de polihistidinas (Figura 21B). Se separaron por SDS-PAGE muestras correspondientes a extractos totales de proteínas inducidas con IPTG o bien a proteínas purificadas. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF y la inmunodetección se realizó utilizando una u otra preparación de anticuerpos primarios.

La incubación con anticuerpos policlonales de conejo frente al complejo RelBE2*Spn* permitió identificar, tanto en los extractos crudos (Figura 21A, calle 1) como en las muestras purificadas (Figura 21A, calle 2), dos bandas con una movilidad aparente que correspondería a un tamaño de 9 kDa y 20 kDa. En la muestra correspondiente a la antitoxina purificada se observa una banda que correspondería a la antitoxina, con un tamaño de 11 kDa, y otra banda adicional, con una movilidad aparente que correspondería a un tamaño de 22 kDa y que podría corresponder a una forma dimérica de esta proteína.

Por otro lado, la incubación con anticuerpos monoclonales frente a polihistidinas permitió detectar la antitoxina (His)₆RelB2*Spn*, con una movilidad aparente que correspondería a un tamaño de 11 kDa. En el caso del complejo antitoxina-toxina purificado, es la toxina RelE2*Spn*(His)₆ la portadora de histidinas y la única que se detecta en estos ensayos, aunque presenta una movilidad electroforética que no se corresponde con su tamaño teórico (11.505 Da) (Figura 21B, calles 2-4).

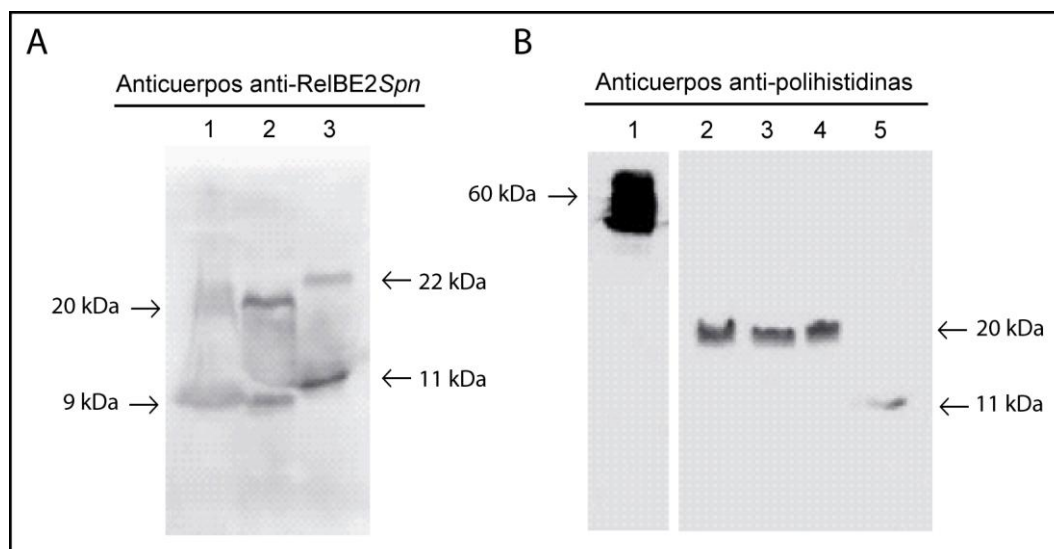


Figura 21. Ensayo de *western blot* utilizando como anticuerpo primario anticuerpos policlonales de conejo frente al complejo RelB2Spn (A) o anticuerpos monoclonales frente a polihistidinas (B). (A) 1. Muestra de la inducción de la síntesis de RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆, 2. Complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ purificado, 3. Antitoxina (His)₆RelB2Spn purificada. (B) 1. Control positivo (proteína de 60 kDa con cola de histidinas), 2-4. Complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ purificado, 5. Antitoxina (His)₆RelB2Spn purificada.

Secuenciación del extremo N-terminal de las proteínas RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ o la antitoxina (His)₆RelB2Spn sobreproducidas en *E. coli*

La secuenciación del extremo N-terminal se realizó a partir de dos tipos de muestras: i) extractos celulares totales, en los que se había inducido la síntesis del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ o de la antitoxina (His)₆RelB2Spn y ii) preparaciones de estas proteínas purificadas, según se indica en el siguiente apartado. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF que a continuación se tiñó para poder detectar y recortar aquellas bandas objeto de análisis.

Además de confirmar la identidad de las proteínas, la secuenciación proporcionó unos datos adicionales sobre la toxina. Mientras que la secuencia del extremo N-terminal de RelB2Spn coincidió con la secuencia deducida para esta proteína (MTTITLK) sin la metionina inicial (Tabla 10), en el caso de RelE2Spn(His)₆, se identificaron dos secuencias para el extremo N-terminal: una minoritaria que coincidió con la esperada para esta proteína (MNNLYKL) y una mayoritaria (MYKLVPT) que carecía de los aminoácidos>NNL. En el caso de la antitoxina (His)₆RelB2Spn, se obtuvo una secuencia del extremo N-terminal que corresponde con la secuencia esperada de la antitoxina, que incluye una cola de 6 histidinas y varios aminoácidos adicionales fruto del clonaje en el vector, pero que carece de la metionina inicial (GSSHHHHHSSGL) (Tabla 10).

Por lo tanto, con ambos tipos de análisis se confirmó que las proteínas que se observaban sobreproducidas en cultivos de *E. coli* portadores de los genes *relBE2Spn* y que presentaban un tamaño aparente de 9,2 y 20 kDa correspondían respectivamente a la antitoxina y toxina. La toxina, como se ha indicado en el apartado anterior, presentaba una migración electroforética anómala en SDS-PAGE, que podría explicarse si consideramos la naturaleza química de estas proteínas (Tabla 9). La toxina *RelE2Spn* es una proteína básica con un $pI = 10,27$, como el resto de toxinas *RelE* homólogas de otros microorganismos (Gerdes 2000). La separación electroforética de las proteínas por SDS-PAGE se realizó a $pH = 8,0$, pH al cual la toxina tendría una carga neta positiva. Por tanto, si las condiciones desnaturizantes en las que se realiza la electroforesis (0,3% SDS en tampón del gel y 0,1% SDS en tampón del cátodo) no son suficientes como para proporcionarle una relación masa / carga uniforme, esta proteína podría ver alterada su migración electroforética. Con el fin de comprobar que la movilidad anómala se debe a las condiciones desnaturizantes utilizadas en la electroforesis, se realizaron geles con mayor porcentaje de SDS (Figura 22). En estas condiciones, se observó un cambio de movilidad electroforética de *RelE2Spn(His)₆*, a medida que se incrementaba el porcentaje de SDS en el ensayo, la movilidad de la toxina iba aumentando hasta alcanzar una migración que coincidía con la de su tamaño teórico (11.505 Da).

Tabla 9. Punto isoeléctrico (pI) de las proteínas *RelB2Spn* y *RelE2Spn*.

	<i>RelB2Spn</i>	<i>RelE2Spn</i>	<i>(His)₆RelB2Spn</i>	<i>RelE2Spn(His)₆</i>
pI	4,37	10,27	5,14	10,12

Los datos se obtuvieron en www.expasy.org/tools/protparam.html.

Purificación de las proteínas

Una vez establecidas las condiciones para la sobreproducción de las proteínas que forman el complejo *RelBE2Spn* o la antitoxina *(His)₆RelB2Spn*, se procedió a su purificación. Los extractos celulares obtenidos de las diferentes preparaciones se aplicaron a una columna de cromatografía de afinidad a níquel y las proteínas fijadas a la columna se eluyeron añadiendo a la columna una solución de 250 mM de imidazol. Se analizaron alícuotas de las fracciones de elución de la columna por SDS-PAGE. El análisis de estas fracciones mostró que *RelB2Spn* y *RelE2Spn(His)₆* se recuperaban en el volumen de elución, ambas proteínas eluían juntas y además la preparación presentaba un alto grado de

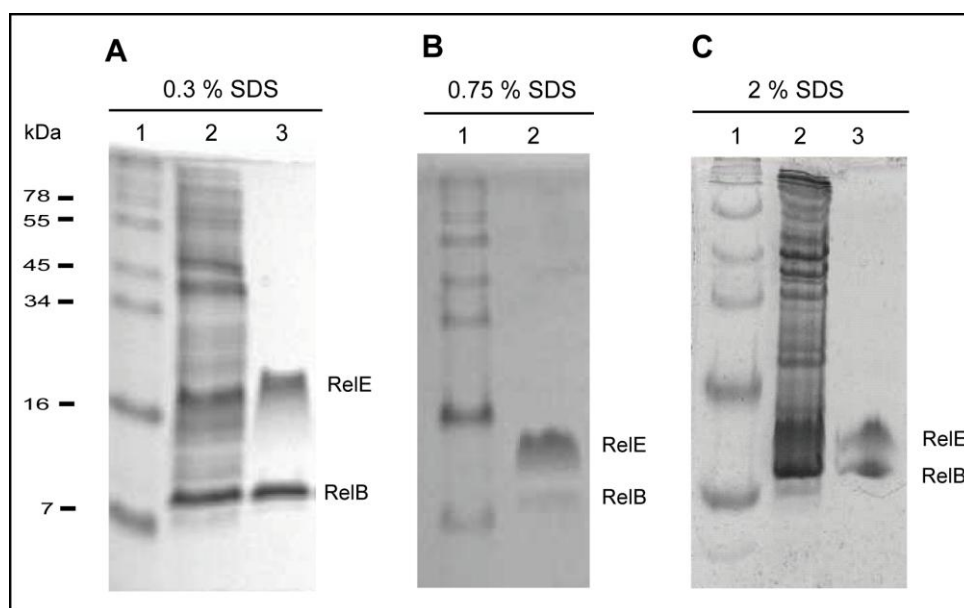


Figura 22. Patrón de migración electroforética de las proteínas RelB2Spn y RelE2Spn en geles de PAA al 16% en presencia de diferentes porcentajes de SDS. (A) Gel con 0,3% SDS en tampón del gel y 0,1% SDS en tampón del cátodo, 1. Marcador de peso molecular *SeeBlue Plus 2*, 2. Muestra recogida tras la inducción con IPTG 3. Complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ purificado. (B) Gel con 0,75% SDS en tampón del gel y en tampón del cátodo, 1. Marcador de peso molecular *SeeBlue Plus 2*, 2. Complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ purificado. (C) Gel con 2% SDS en tampón del gel y en tampón del cátodo, 1. Marcador de peso molecular *SeeBlue Plus 2*, 2. Muestra recogida tras la inducción con IPTG 3. Complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ purificado.

pureza (Figura 23). Por el contrario en la preparación correspondiente a la antitoxina (His)₆RelB2Spn se detectaron algunas proteínas contaminantes que eluían con la antitoxina (Figura 24). Las fracciones de la columna de níquel enriquecidas en el complejo o en la antitoxina se cargaron en una columna de cromatografía de filtración en gel. En los cromatogramas de ambas preparaciones se observó un pico de máxima absorción a 280 nm que coincidió con la elución de las proteínas sobreproducidas del extracto (Figuras 23 y 24). El rendimiento final obtenido fue de 1,3 mg de complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn y 1,25 mg de antitoxina (His)₆RelB2Spn por cada litro de cultivo de células inducido, con una pureza superior al 95%.

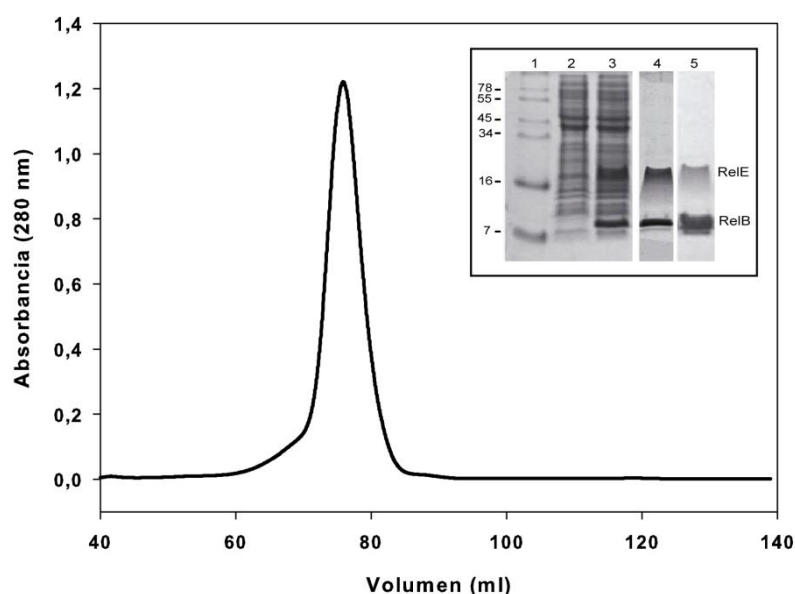


Figura 23. Purificación del complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn. El gráfico muestra el perfil de elución de RelB2Spn-RelE2His₆Spn en una columna de filtración en gel. En la imagen interior se muestra el análisis de las diferentes etapas de purificación mediante SDS-PAGE. 1. Marcador de peso molecular *SeeBlue Plus 2*, 2. Muestra recogida antes de la inducción, 3. Muestra recogida tras la inducción. 4. Fracción de la muestra eluida de la columna de afinidad por níquel, 5. Muestra de las proteínas purificadas por filtración en gel.

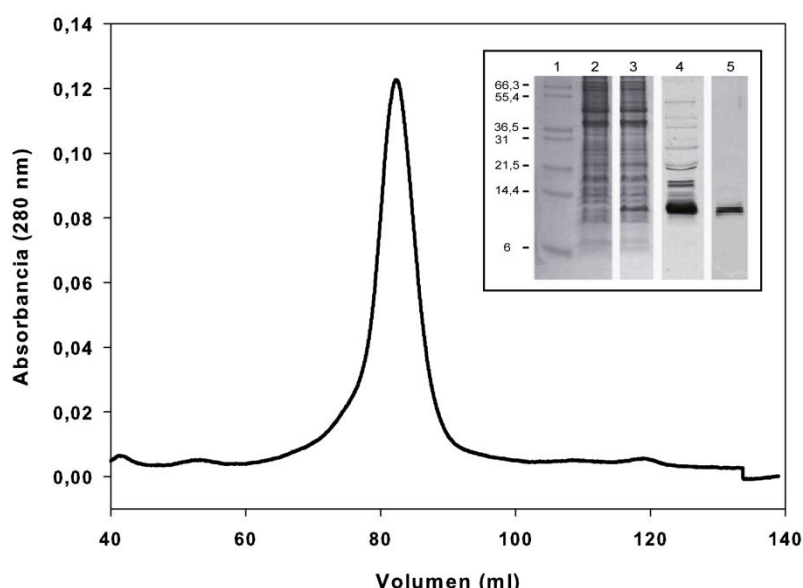


Figura 24. Purificación de la antitoxina (His)₆RelB2Spn. El gráfico muestra el perfil de elución de (His)₆RelB2Spn en una columna de filtración en gel. En la imagen interior se muestra el análisis de las diferentes etapas de purificación mediante SDS-PAGE. 1. Marcador de peso molecular *Mark12*, 2. Muestra recogida antes de la inducción, 3. Muestra recogida tras la inducción. 4. Fracción de la muestra eluida de la columna de afinidad por níquel, 5. Muestra de la proteína purificada por filtración en gel.

1.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO RelB2*Spn* Y DE LA ANTITOXINA RelB2*Spn*

1.2.1. Determinación de la masa molecular de la antitoxina y de la toxina obtenidas a partir de preparaciones de las proteínas RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ o de (His)₆RelB2*Spn* purificadas

Espectrometría de masas MALDI-TOF

La determinación de la masa molar, derivada de la secuencia primaria de la proteína, permite detectar e identificar las diferentes especies proteicas que se encuentran en una muestra. La espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizó para determinar la masa molecular de la antitoxina His₆RelB2*Spn* y del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* purificados. Se adquirieron espectros de masas del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* en modo positivo (detección de iones cargados positivamente) y en modo de extracción lineal retrasado. Como resultado se obtuvieron cuatro picos en el rango de 9.000 a 11.500 m/z (Figura 25). Los picos con un valor de 9.209,1 y 9.073,7 m/z corresponderían con la masa teórica de la antitoxina RelB2*Spn* esperada para la secuencia completa de aminoácidos (9.205 Da) y con la masa teórica de la antitoxina sin el aminoácido M inicial (9.074 Da), respectivamente (Tabla 10), siendo esta última mayoritaria. Además, se observó un pico mayoritario con un valor de 11.161,2 m/z, que corresponde con la masa teórica de la toxina RelE2His₆*Spn* sin los aminoácidos>NNL (11.163,78 Da) (Tabla 10) y un pico muy minoritario a 11.498,5 m/z, que corresponde a la masa teórica de la toxina esperada para la secuencia completa de aminoácidos (11.505 Da). Por tanto, los resultados obtenidos para la toxina coinciden con los obtenidos en la secuenciación del extremo N-terminal, mientras que la antitoxina presenta una forma adicional sin el aminoácido M inicial y que, según la técnica de espectrometría de masas, parece mayoritaria.

El espectro de masas adquirido para la antitoxina His₆RelB2*Spn* (del mismo modo que para el complejo), mostró la presencia de un pico mayoritario a 9.073 m/z (Figura 26), correspondiente a la masa teórica de la antitoxina que carece de la cola de histidinas y del aminoácido M inicial (9.074 Da) (Tabla 10). Los otros dos picos con un valor de 9.207,8 y 9.247 m/z, presentes en la misma proporción, podrían corresponder, el primero a la masa teórica de la antitoxina sin la cola de histidinas pero manteniendo la M inicial (9.205 Da); el segundo pico no se corresponde con ninguna especie definida y podría ser una mezcla de proteínas que incluiría la antitoxina sin su M inicial y con alguno de los aminoácidos de la cola de His. El hecho de que mediante esta técnica la antitoxina His₆RelB2*Spn* pierda la cola de histidinas puede deberse a la estabilidad de la proteína en las condiciones del ensayo, ya que la secuenciación del extremo N-terminal confirmó la presencia de ésta.

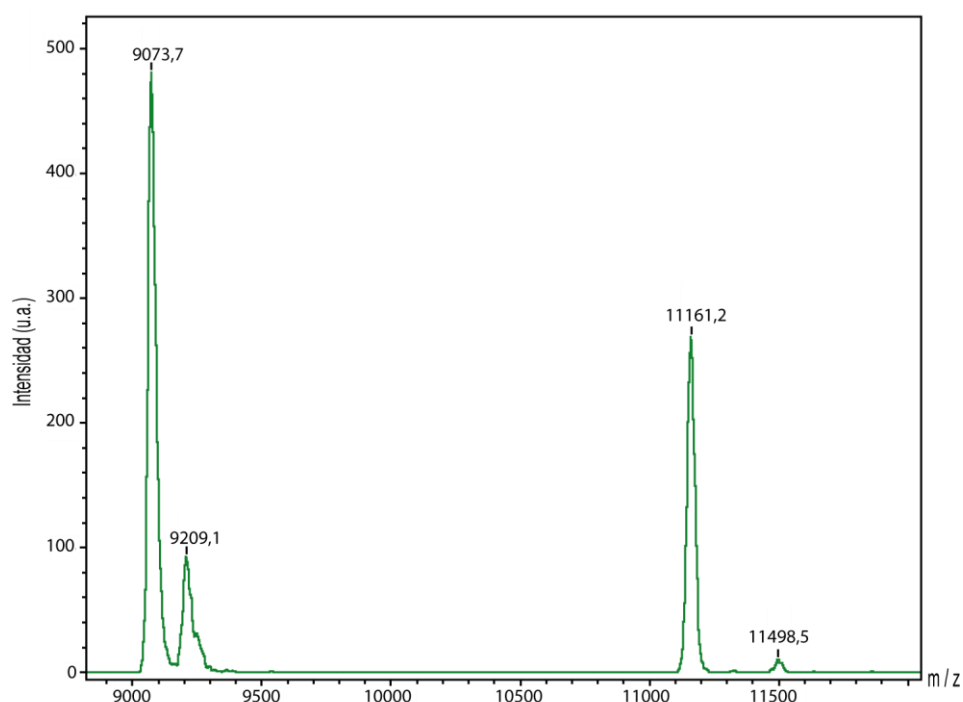


Figura 25. Espectro de masas MALDI-TOF del complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn. Espectro de masas MALDI-TOF obtenido a partir del complejo RelB2Spn-RelE2His₆Spn adquirido en modo positivo y en modo de extracción lineal retrasado. Se indican los valores m/z obtenidos para cada pico.

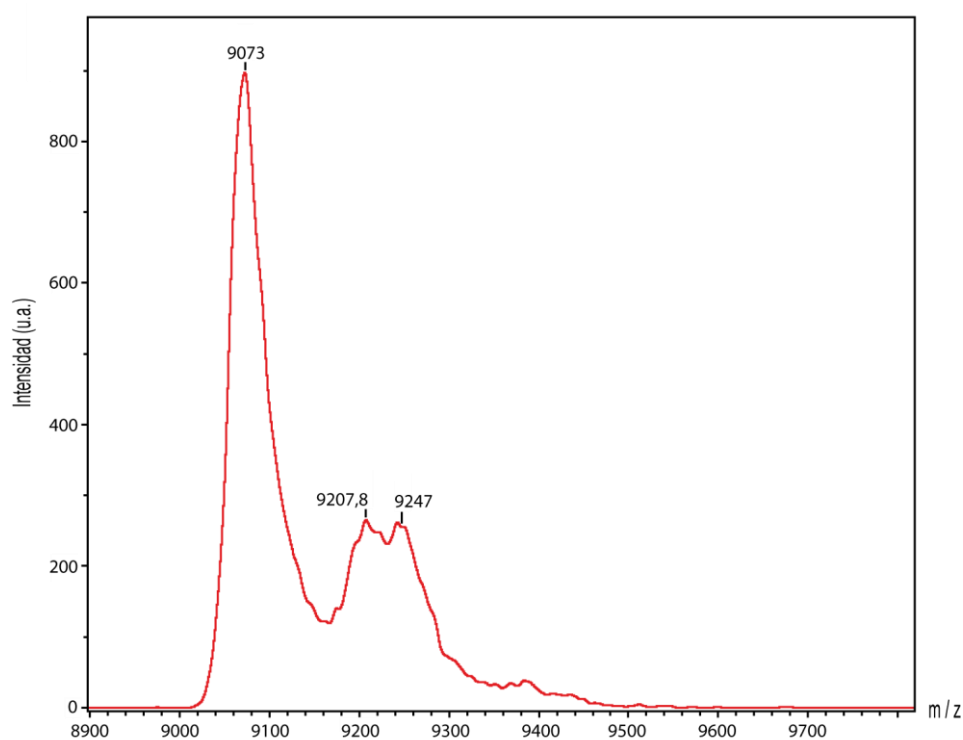


Figura 26. Espectro de masas MALDI-TOF de la antitoxina His₆RelB2Spn adquirido en modo positivo y en modo de extracción lineal retrasado. Se indican los valores m/z obtenidos para cada pico.

Espectrometría de masas ESI Q-TOF

El análisis de masa molecular de los componentes del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* también se realizó utilizando espectrometría de masas ESI Q-TOF. Esta técnica permite, según las condiciones del ensayo, analizar complejos sin que se produzca su disociación, y por tanto calcular la masa molecular del complejo en estado nativo (Phizicky y Fields, 1995). Los datos fueron adquiridos en un rango de masas amplio (7.000-75.000 Da) con el objetivo de observar la masa del complejo. Sin embargo, se observaron picos correspondientes a la masa de los monómeros de la antitoxina y toxina, y no se observó ningún pico por encima de 11.600 Da. Como se muestra en la figura 27, en el rango de 9.000 a 11.600 Da se obtuvieron los siguientes resultados: dos picos de 9.074 y 9.207 Da que corresponden con la masa teórica de la antitoxina carente del aminoácido M inicial (9.074 Da) y la antitoxina completa (9.205 Da), respectivamente; y otros dos picos de 11.165 y 11.506 Da correspondientes con la masa teórica de la toxina carente de los aminoácidos>NNL (11.163,78 Da) y la toxina completa (11.505 Da), respectivamente. Los picos a la derecha de cada uno de estos picos corresponden con formas oxidadas de cada monómero. Cada oxidación incrementa la masa molecular en 16 Da y suelen ser artefactos comunes en esta técnica de espectrometría de masas. Por lo tanto, esta técnica confirma que en *E. coli* la sobreproducción del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* genera dos formas de antitoxina y otras dos de toxina.

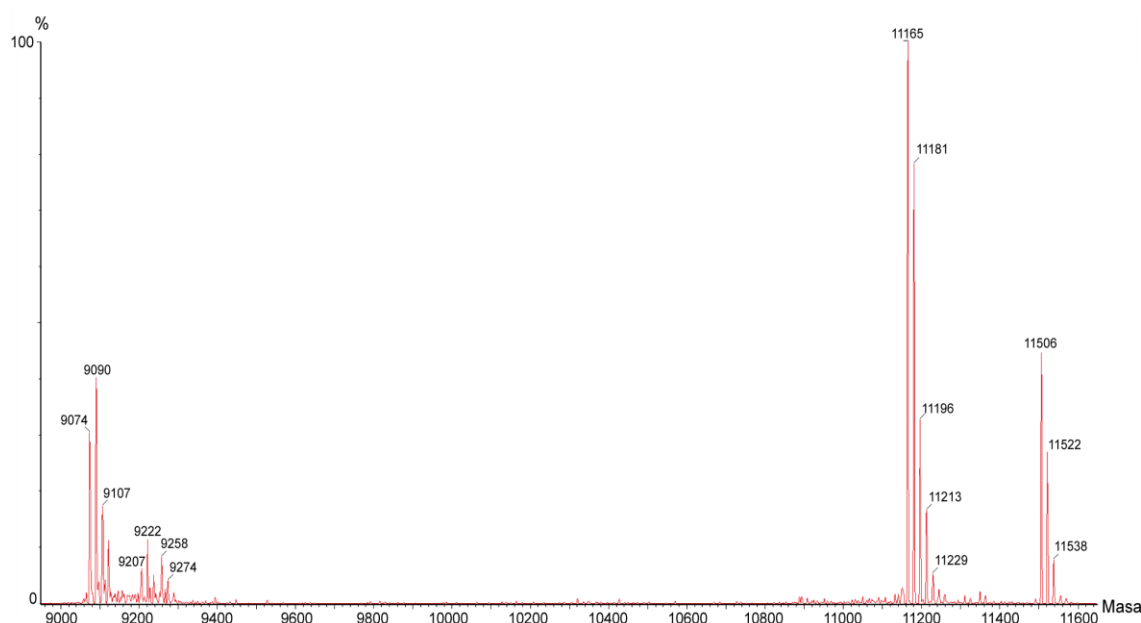


Figura 27. Espectro de masas ESI Q-TOF del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn*. Se indican los valores de masa obtenidos para cada pico.

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de las diferentes moléculas de RelB2*Spn* y RelE2*Spn* detectadas por MALDI-TOF o ESI Q-TOF y cuyo extremo N-terminal ha sido identificado por secuenciación.

	M teórica
RelB2 <i>Spn</i> : MTTITLVSEADKTFMKAMAKFEGVSLSELIRTKTLEALDEYDARVADLAYQEYLEDEKGVPEITWEEMMHDGLKDE	9.205 Da
RelB2 <i>Spn</i> (-M): TTITLVSEADKTFMKAMAKFEGVSLSELIRTKTLEALDEYDARVADLAYQEYLEDEKGVPEITWEEMMHDGLKDE	9.074 Da
RelE2His ₆ <i>Spn</i> : MNNLYKLVPTRRFIQQLKLDTRYTQKLITNYLQTNVLEDPRRHGKALVGNRVGQWRYRIGNYRVIVQIVDELVVATLEVGHRRDIYLEHHHHHH	11.505 Da
RelE2His ₆ <i>Spn</i> (-MNN): MYKLVPTRRFIQQLKLDTRYTQKLITNYLQTNVLEDPRRHGKALVGNRVGQWRYRIGNYRVIVQIVDELVVATLEVGHRRDIYLEHHHHHH	11.163,78 Da
His ₆ RelB2 <i>Spn</i> : MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTTITLVSEADKTFMKAMAKFEGVSLSELIRTKTLEALDEYDARVADLAYQEYLEDEKGVPEITWEEMMHDGLKDE	11.368,7 Da
His ₆ RelB2 <i>Spn</i> (-M): GSSHHHHHSSGLVPRGSHMTTITLVSEADKTFMKAMAKFEGVSLSELIRTKTLEALDEYDARVADLAYQEYLEDEKGVPEITWEEMMHDGLKDE	11.237,5 Da

M: masa molecular

1.2.2. Estructura secundaria del complejo RelBE2*Spn* y de la antitoxina RelB2*Spn*

La estructura secundaria de las proteínas se analizó mediante dos técnicas diferentes: métodos computacionales y análisis de espectroscopía de DC.

Análisis bioinformático

Los métodos de análisis bioinformático utilizan diferentes algoritmos para asignar regiones en la proteína con probables estructuras secundarias (hélice- α , cadena β). Este análisis bioinformático de predicción de estructura secundaria de las proteínas RelB2*Spn* y RelE2*Spn* se realizó utilizando cinco programas de predicción diferentes (Porter, PSIPred, Jpred, SABLE y PredictProtein; Tabla 11).

La predicción de estructura secundaria para estas proteínas indicaba que la antitoxina RelB2*Spn* está compuesta mayoritariamente por hélices- α mientras que la toxina no parece tener una estructura secundaria predominante pero presentaba un contenido relativamente alto de estructuras no regulares (giros, bucles) o estructuras desordenadas (en inglés *random coils*; Tabla 11).

La representación de los elementos de estructura secundaria sobre la secuencia de aminoácidos (Figura 28) se realizó utilizando el método de predicción Porter. Se eligió este método para determinar la distribución de residuos, por su elevado índice Q3 (porcentaje de residuos correctamente asignados por un método de predicción), aproximadamente de un 80%, calculado utilizando el servidor EVA (Eyrich, *et al.*, 2001). La representación de la distribución de elementos de estructura secundaria en la figura 28 sugiere que la estructura secundaria de la antitoxina RelB2*Spn* estaría mayoritariamente constituida por hélices- α y por una única cadena- β localizada en su extremo amino terminal. Sin embargo, en la estructura secundaria de la toxina RelE2*Spn*

puede observarse una alternancia de regiones de hélices- α y cadenas- β , así como regiones con otro tipo de estructuras (giros o estructuras no regulares).

Tabla 11. Predicción del contenido en estructura secundaria (%) de RelB2*Spn* y RelE2*Spn*.

	RelB2 <i>Spn</i>			RelE2 <i>Spn</i>		
PROGRAMA	Hélice- α	Cadena- β	Otras estructuras	Hélice- α	Cadena- β	Otras estructuras
Porter	71,25	5	23,75	28,73	35,63	34,48
PSIpred	62,50	2,50	13,75	26,40	31	19,50
JPRED	58,75	3,75	15	19,50	20,60	29,80
SABLE	55	2,50	7,5	25,30	18,40	20,70
PredictProtein	40	0	8,75	18,40	11,50	8,04



Figura 28. Predicción de la distribución de estructuras secundarias sobre la secuencia de RelB2*Spn* y RelE2*Spn* mediante el programa Porter. Las hélices- α se representan con rectángulos rojos y las cadenas- β con flechas verdes.

Análisis de espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Contenido en estructura secundaria: Espectro de DC de His₆RelB2*Spn* y RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆

El espectro de DC de la antitoxina His₆RelB2*Spn* (Figura 29) en la región lejana del UV (185-260 nm) a 0°C y a 30°C mostró dos mínimos en la señal de elipticidad, a 208 y 222 nm, indicativo de la presencia de hélices- α . El máximo a 192 nm, también característico de hélices- α , no se pudo detectar claramente debido a la alta fuerza iónica del tampón (500 mM) que producía interferencias a esta longitud de onda. La elevada fuerza iónica del tampón mantiene la proteína en solución, una reducción en la concentración de sal provoca la precipitación de la proteína. El contenido en estructura secundaria de la antitoxina His₆RelB2*Spn* fue estimado por cuatro métodos de deconvolución del espectro de DC (Tabla 12). Los resultados obtenidos con los cuatro métodos fueron similares, con unos valores medios de $32 \pm 3,5\%$ de hélices- α , $21 \pm 5,6\%$ de cadenas- β y $47 \pm 8,5\%$

asignado a otras estructuras no regulares o giros a 0°C, y $36 \pm 7,2\%$ de hélices- α , $14 \pm 4,7\%$ de cadenas- β y $49 \pm 12\%$ de otras estructuras a 30°C.

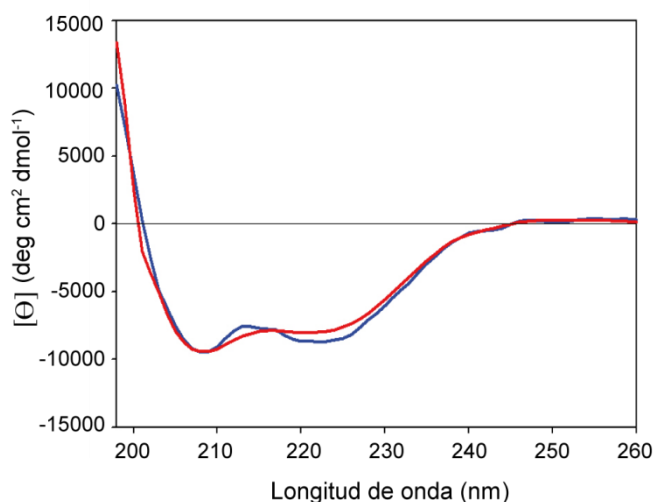


Figura 29. Espectro de DC de la antitoxina His₆RelB2Spn (20 μM) en el UV lejano, en tampón DC suplementado con 500 mM de NaCl adquirido a 0°C (línea azul) y a 30°C (línea roja). El espectro presenta dos mínimos de elipticidad a 208 y 222 nm, característicos de proteínas con alto contenido en hélice- α .

Tabla 12. Contenido en estructura secundaria (%) de la antitoxina His₆RelB2Spn.

Método	RelB2Spn					
	Hélice- α		Cadena- β		Otras estructuras	
	0°C	30°C	0°C	30°C	0°C	30°C
SELCON3	28,5	32,5	18,4	15,4	52	53,1
CONTIN	31,2	34,5	27,9	8,6	45,8	56,8
CDSSTR	37,6	48	26	21,6	36,3	30,3
K2D	30	29	14	13	56	58
Media	$32 \pm 3,5$	$36 \pm 7,2$	$21 \pm 5,6$	$14 \pm 4,7$	$47 \pm 8,5$	49 ± 12

En el espectro de DC del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ a 0°C y a 30°C (Figura 30) se distinguen dos mínimos a 208 y 222 nm y un máximo alrededor de 192 nm. Este espectro es compatible con los datos obtenidos de la deconvolución que muestran una presencia relativamente alta de hélices- α ($38 \pm$

1,4%), una menor presencia de cadenas- β ($18 \pm 2,3\%$) y un $47 \pm 9,6\%$ de otras estructuras no regulares o giros a 0°C , y $39 \pm 2,8\%$ de hélices- α , $15 \pm 4\%$ de cadenas- β y $47 \pm 8,4\%$ de otras estructuras a 30°C (Tabla 13).

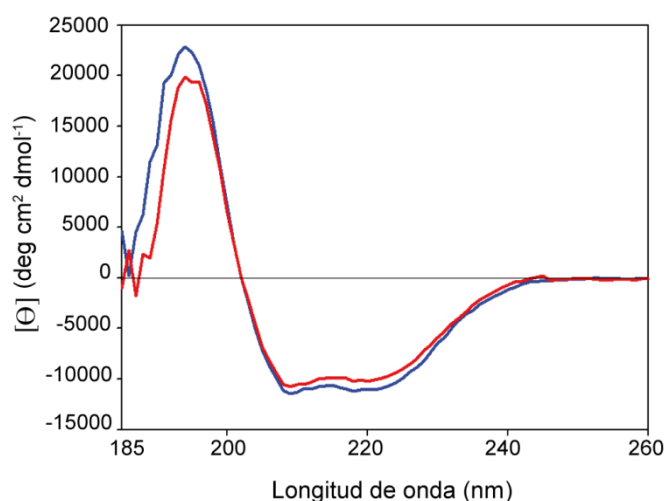


Figura 30. Espectro de DC del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ ($40 \mu\text{M}$) en el UV lejano, en tampón DC suplementado con 50 mM de NaCl adquirido a 0°C (línea azul) y a 30°C (línea roja). El espectro presenta dos mínimos de elipticidad a 208 y 222 nm y un máximo alrededor de 192 nm, característicos de proteínas con alto contenido en hélice- α .

Tabla 13. Contenido en estructura secundaria (%) del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆.

	RelBE2Spn					
Método	Hélice- α		Cadena- β		Otras estructuras	
	0°C	30°C	0°C	30°C	0°C	30°C
SELCON3	37,2	38,3	16,1	13,9	46,1	46,6
CONTIN	37	40,8	17,5	12	45,4	47
CDSSTR	40,3	43,6	17	12,3	42,6	44
K2D	37	36	22	22	42	42
Media	$38 \pm 1,4$	$39 \pm 2,8$	$18 \pm 2,3$	15 ± 4	$47 \pm 9,6$	$47 \pm 8,4$

Estabilidad térmica: Análisis del espectro de DC del complejo RelB2Spn y de la antitoxina RelB2Spn de 10°C a 80°C

Los cambios en la estructura secundaria de His₆RelB2Spn y del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ inducidos por el aumento de la temperatura fueron analizados por DC en el UV lejano. En estos ensayos se recogieron los cambios en la elipticidad a 220 nm en función del aumento de temperatura de 10°C a 80°C, y los espectros desde 200 nm a 260 nm a diferentes temperaturas (10, 30, 50, 60, 70 y 80°C).

Los resultados obtenidos con la antitoxina indicaban una pérdida progresiva en la señal de elipticidad de His₆RelB2Spn a medida que aumentaba la temperatura (Figura 31A). Finalmente, a 80°C el espectro de DC de la antitoxina His₆RelB2Spn se correlacionó con una conformación desordenada. Tras normalizar y representar los datos experimentales obtenidos frente a la temperatura, se realizó un ajuste a un modelo de dos estados de transición (desde la proteína plegada a la proteína desnaturalizada), a partir del cual se pudo estimar la temperatura de desnaturalización (T_m). La T_m estimada para la antitoxina fue 58,2°C (Figura 31E).

En el caso del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆, el espectro de DC mostró una pérdida drástica en la señal de elipticidad a medida que aumentaba la temperatura (Figura 31B), sin embargo no se observó ningún cambio en el perfil global, lo que sugiere que el cambio en elipticidad se puede atribuir a una agregación de la proteína a alta temperatura. De hecho, cuando la muestra se calienta 80°C presenta una cierta turbidez, mientras que esta no se observa en las preparaciones de antitoxina, indicando que la antitoxina tiene una mayor estabilidad térmica que el complejo TA. Considerando el perfil de desnaturalización térmica (Figura 31F), la T_m estimada para el complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ fue 59,7°C.

Para analizar la capacidad de renaturalización de la antitoxina y el complejo las muestras, una vez calentadas hasta alcanzar 80°C, fueron enfriadas hasta los 10°C y se recogieron espectros en el mismo rango de longitud de onda. Los resultados mostraron que la antitoxina presenta una renaturalización parcial ya que recupera a 10°C la señal de elipticidad y el perfil es similar al recogido previamente (Figura 31C), sin embargo, el complejo no mostró esta capacidad de reversibilidad (Figura 31D).

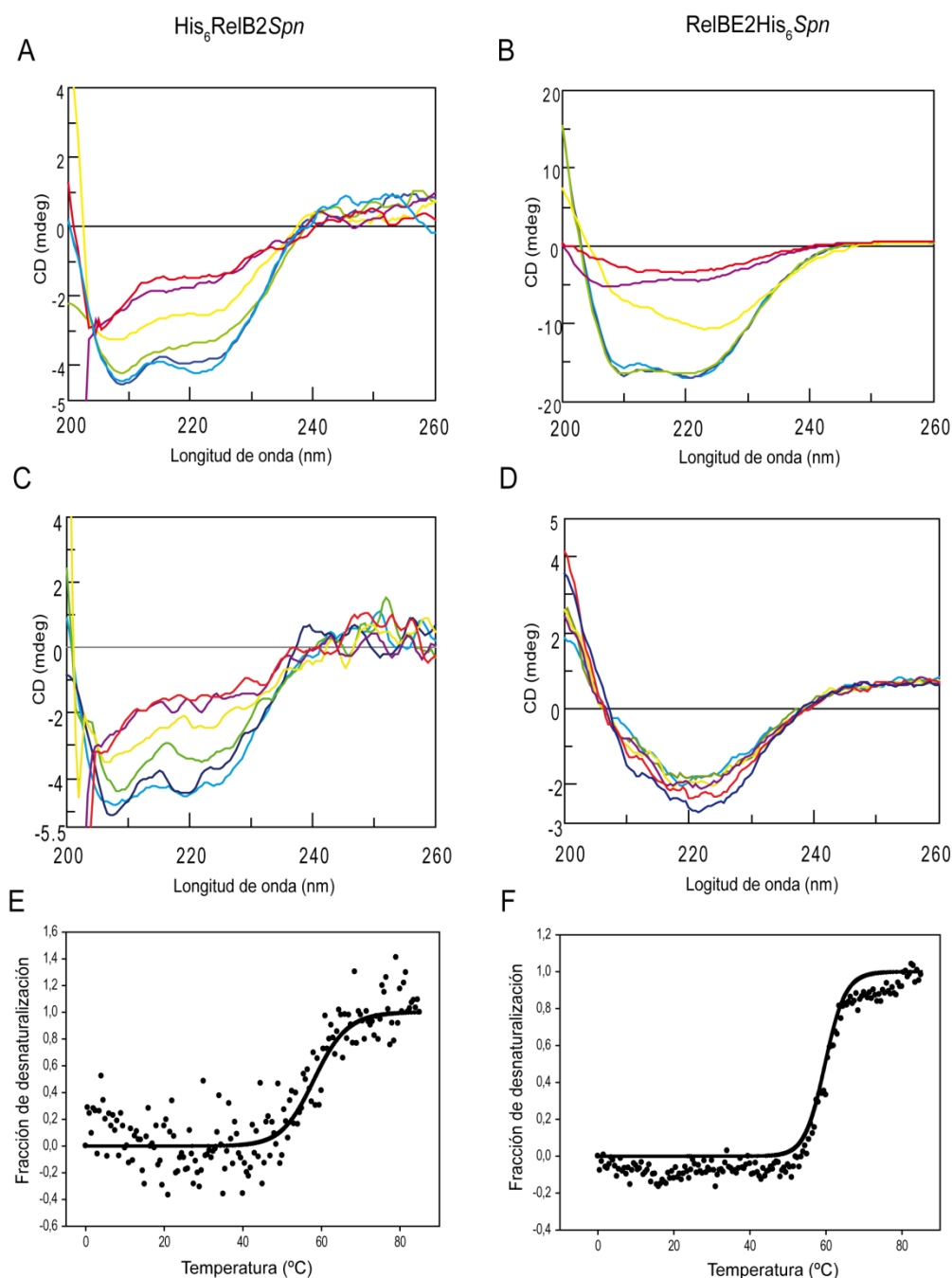


Figura 31. Estabilidad térmica del complejo RelB2Spn y de la antitoxina RelB2Spn. Espectros de DC en el UV lejano de la antitoxina His₆RelB2Spn (A) y del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆ (B) obtenidos en un rango de temperaturas de 10°C a 80°C. Se muestran los espectros obtenidos a 10°C (azul celeste), 30°C (azul oscuro), 50°C (verde), 60°C (amarillo), 70°C (violeta) y 80°C (rojo). Después el incremento de temperatura se revirtió de 80°C a 10°C. En (C) se muestran los espectros de DC de la antitoxina His₆RelB2Spn y en (D) los espectros de DC del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆, obtenidos a 10°C (azul celeste), 30°C (azul oscuro), 50°C (verde), 60°C (amarillo), 70°C (violeta) y 80°C (rojo). (E) Perfil de desnaturalización de la antitoxina His₆RelB2Spn. (F) Perfil de desnaturalización del complejo RelB2Spn-RelE2Spn(His)₆. Los cambios en la señal de elipticidad se registraron a 220 nm en un rango de temperatura de 0°C a 80°C. Los datos experimentales normalizados (puntos) se ajustaron a un modelo de dos estados (curvas).

1.2.3. Estados de asociación del complejo RelB2*Spn* y de la antitoxina RelB2*Spn*

La determinación de los estados de oligomerización del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ y de la antitoxina (His)₆RelB2*Spn* se llevó a cabo mediante tres técnicas: UA, EMN y análisis de la composición de aminoácidos.

Estados de oligomerización de la antitoxina RelB2*Spn*

Ensayos de ultracentrifugación analítica

Las técnicas de UA, velocidad de sedimentación (VS) y equilibrio de sedimentación (ES), permiten conocer las características hidrodinámicas de las proteínas (tamaño, forma global y grado de homogeneidad), así como detectar las interacciones moleculares que pueden dar lugar a la formación de complejos. En concreto, para determinar los estados de oligomerización de la antitoxina (His)₆RelB2*Spn* en solución, se realizaron análisis tanto de SV como de ES, ya que ambos son complementarios. Los ensayos de VS aportan información sobre el grado de homogeneidad o heterogeneidad de la muestra. En estos experimentos se utilizaron diferentes concentraciones de (His)₆RelB2*Spn* (8,75 μ M, 21,8 μ M y 32,8 μ M) y en todas ellas se obtuvo un perfil de sedimentación similar. Los perfiles de sedimentación (Figura 32) indicaban la presencia de tres especies, una mayoritaria, (95%), con un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $2,2 \pm 0,1$ S; y otras dos minoritarias en porcentajes de 3,3% y $S_{20,w}$ de $4,1 \pm 0,1$ S; y otra con 1,4%, y $S_{20,w}$ de $5,8 \pm 0,1$ S. Estos valores son compatibles una especie dimerica mayoritaria de antitoxina (His)₆RelB2*Spn* (22.738 Da; $2,2 \pm 0,1$ S) y un pequeño porcentaje de agregados no específicos cuya formación es independiente de la concentración de proteína utilizada en los ensayos. Por su parte, los ensayos de ES permiten la determinación de la masa molecular de las especies que sedimentan. Para estos ensayos se utilizaron las mismas concentraciones de (His)₆RelB2*Spn* que para los de VS, y todos los perfiles fueron muy similares entre sí. Los datos experimentales presentaron el mejor ajuste a una masa molecular promedio ($M_{w,a}$) de 25.700 ± 300 Da, valor que corresponde con la masa molecular teórica de un dímero de antitoxina (His)₆RelB2*Spn* (22.736 Da). La relación friccional (f/f_0) obtenida en los ensayos de ultracentrifugación analítica fue 1,3, indicando que el dímero de (His)₆RelB2*Spn* podría tener una forma esférica.

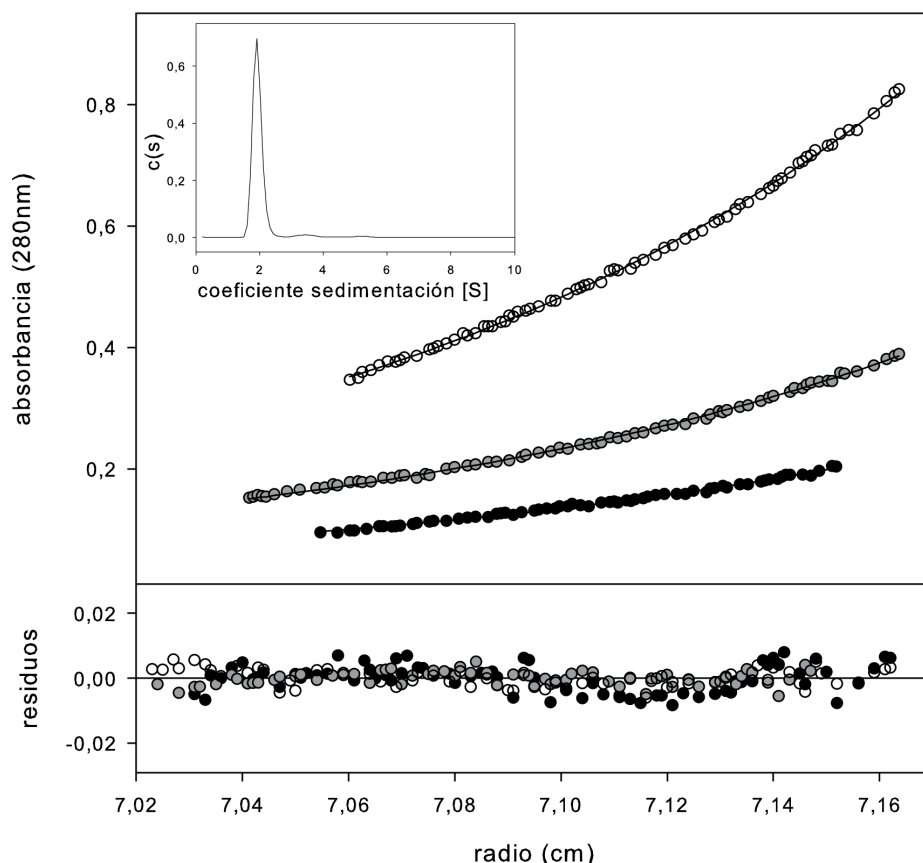


Figura 32. Estados de oligomerización de la antitoxina $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$. Gradientes de equilibrio de sedimentación de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$ a $8,75 \mu\text{M}$ (círculos negros), $21,8 \mu\text{M}$ (círculos grises), y $32,8 \mu\text{M}$ (círculos blancos). Los círculos representan los datos experimentales y la línea continua es el mejor ajuste a $M_{w,a}$ de $25.700 \pm 300 \text{ Da}$. El gráfico interior muestra la distribución de coeficiente de sedimentación determinada para $21,8 \mu\text{M}$ de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$.

Espectrometría de masas nativa

La EMN permite determinar el grado de oligomerización de una muestra y definir de forma precisa la estequiometría de los componentes de un complejo proteico. El espectro de masas de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$ ($10 \mu\text{M}$) mostró dos series de iones que pueden ser asignadas a un monómero o un dímero de la antitoxina, correspondiendo la mayoría de los picos a $1650\text{-}1900 \text{ m/z}$ a la especie monomérica y a $2300\text{-}2500 \text{ m/z}$ a la especie dimérica (Figura 33). Algunos de los picos pueden corresponder al monómero o al dímero pero con diferente carga. La determinación de la masa de ambas series de iones produjo masas de 11.238 y 22.476 Da , que corresponden con las masas teóricas del monómero (11.368 Da) y del dímero (22.736 Da) de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$, respectivamente.

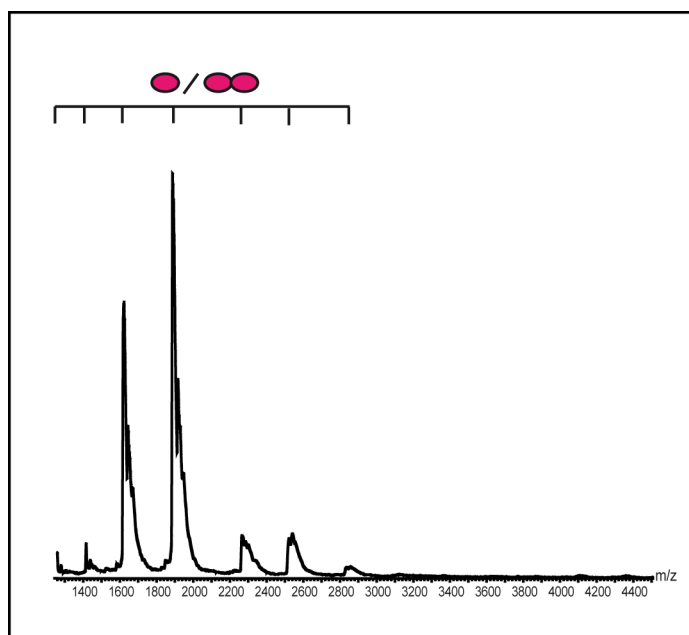


Figura 33. Perfil de espectrometría de masas nativa de la antitoxina: espectro de masas de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$ ($10\ \mu\text{M}$). El monómero y el dímero de $(\text{His})_6\text{RelB2Spn}$ se representan con una o dos elipses rosas, respectivamente.

Estados de oligomerización del complejo RelBE2Spn

Ensayos de ultracentrifugación analítica

En los ensayos de VS y ES se utilizaron diferentes concentraciones (10 , 25 y $50\ \mu\text{M}$) del complejo. Los análisis de VS indicaban que en la muestra de $\text{RelB2Spn-RelE2Spn}(\text{His})_6$ se podían detectar 3 especies diferentes (Figura 34). Una especie mayoritaria, 85% , con un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $3,7 \pm 0,1\ \text{S}$ y dos minoritarias una con una representación de un 12% , con un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $2,6 \pm 0,1\ \text{S}$ y otra presente en menos de un 3% , con un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $6,1 \pm 0,1\ \text{S}$. Estos resultados son compatibles con la presencia mayoritaria en solución de un heterohexámero ($\sim 60.000\ \text{Da}$), un menor porcentaje (12%) de un heterotrímero ($\sim 30.000\ \text{Da}$), y una pequeña aportación (menor 3%) de un heterododecámero ($\sim 119.500\ \text{Da}$) de $\text{RelB2Spn-RelE2Spn}(\text{His})_6$.

Los datos experimentales obtenidos en los ensayos de ES se ajustaron a un modelo de varias especies para calcular la masa molecular aparente ($M_{w,a}$) de cada una. Los resultados mostraron la presencia de dos especies mayoritarias correspondientes al heterotrímero y al heterohexámero, siendo la contribución del heterododecámero despreciable debido a su presencia en una pequeña proporción (menos del 3%). Todas las concentraciones utilizadas mostraron un perfil de sedimentación similar y una masa molecular promedio ($M_{w,a}$) de $55.900 \pm 1.700\ \text{Da}$, valor que corresponde con la masa molecular teórica de un heterohexámero de $\text{RelB2Spn-RelE2Spn}(\text{His})_6$ ($\sim 60.000\ \text{Da}$) con una pequeña

proporción de heterotrímero (~13%). Los datos correspondientes a 50 μM de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ fueron tomados a 296 nm pero transformados a 280 nm para su representación (Figura 34). Los valores de relación friccional (f/f_0) calculados para el heterotrímero y heterohexámero fueron 1,2 y 1,3; respectivamente, datos compatibles con una forma esférica de ambos oligómeros.

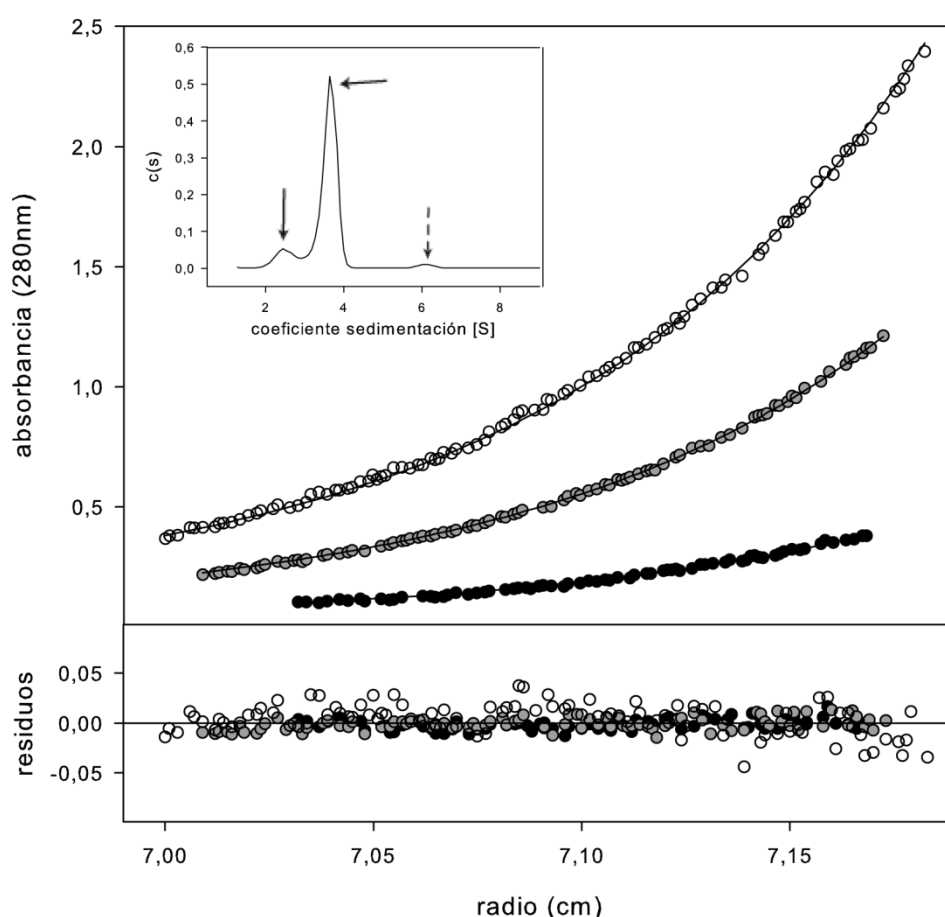


Figura 34. Estados de oligomerización del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆. Gradientes de equilibrio de sedimentación de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ a 10 μM (círculos negros), 25 μM (círculos grises), y 50 μM (círculos blancos). Los círculos representan los datos experimentales y la línea continua es el mejor ajuste a un modelo de varias especies. El gráfico interior muestra la distribución de coeficiente de sedimentación determinada para 10 μM de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆. Las flechas continuas indican las dos especies mayoritarias identificadas: heterotrímero (12%) y heterohexámero (85%) y la flecha discontinua indica la posición de un posible heterododecámero.

Espectrometría de masas nativa

El espectro de masas mostró cuatro series de iones (Figura 35). Se obtuvieron picos a 1600-2500 m/z que corresponden con antitoxina RelB2*Spn* libre, pero no se observaron picos correspondientes a toxina RelE2*Spn* libre. Este hecho puede deberse a los niveles relativos de ambas proteínas cuando el complejo se purificó, es decir, la antitoxina se produjo en exceso ya que todas las toxinas encontradas estaban acomplejadas con la antitoxina. Además de antitoxina libre, el espectro y la determinación de masas mostraron la presencia de diferentes complejos. La aparición de una abundante serie de iones en el rango 3800-4300 m/z podría ser asignada a un heterohexámero compuesto por (RelB2*Spn*)₂-(RelE2His₆*Spn*)₂-(RelB2*Spn*)₂ (59.836 Da). Las otras dos series de iones minoritarias fueron identificadas como un heterotrímero compuesto por (RelB2*Spn*)₂-(RelE2His₆*Spn*)₁ (29.918 Da) en el rango 2500-3000 m/z, y como un heterododecámero {(RelB2*Spn*)₂-(RelE2His₆*Spn*)₂-(RelB2*Spn*)₂}₂ (119.672 Da) en el rango 5200-6000 m/z.

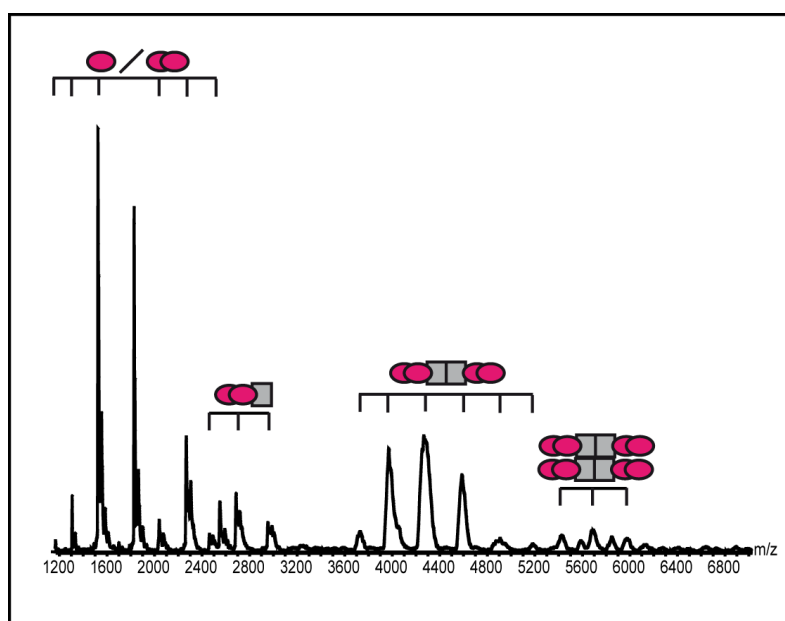


Figura 35. Perfil de espectrometría de masas nativa del complejo TA: espectro de masas de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ (20 μM). El monómero de antitoxina RelB2*Spn* se representa con una elipse rosa y el monómero de toxina RelE2*Spn*(His)₆ con un cuadrado gris. Cada complejo se representa con la combinación apropiada de elipses y cuadrados.

Composición de aminoácidos del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆

Como ensayo adicional para determinar la estequiometría del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆, se determinó la composición de aminoácidos de esta muestra. En este ensayo se compararon los valores de composición molar experimentales, con los valores teóricos de las posibles estequiometrias de asociación de la antitoxina y la toxina, siendo la relación 2:1 de RelB2*Spn*:RelE2*Spn*(His)₆ la que mejor se ajustaba a los valores experimentales (Tabla 14). Este resultado coincide con el obtenido en los ensayos previos de espectrometría de masas nativa.

Tabla 14. Composición de aminoácidos del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆.

Aminoácido	RelB (%)	RelEHis ₆ (%)	RelB:RelEHis ₆ Relación 2:1	RelB:RelEHis ₆ Relación 1:2	RelB:RelEHis ₆ Relación 1:1	Comp. molar (%) Valor Exp.
Asx(D+N)	8.8	11.6	9.73	10.66	10.2	9.85
T	8.8	5.3	7.63	6.46	7.05	7.81
S	3.8	0	2.53	1.26	1.90	2.55
Glx(E+Q)	17.4	9.5	14.76	12.13	13.45	14.87
P	1.2	2.1	1.50	1.80	1.65	1.72
G	3.8	5.3	4.30	4.80	4.55	4.58
A	8.8	2.1	6.56	4.30	5.45	6.34
V	5.0	10.5	6.83	8.66	7.75	6.44
M	6.2	1.1	4.50	2.80	3.65	3.93
I	3.8	6.3	4.63	5.46	5.05	4.03
L	12.5	11.6	12.2	11.9	12.05	12.45
Y	3.8	6.3	4.63	5.46	5.05	4.80
F	2.5	1.1	2.03	1.56	1.80	2.03
H	1.2	8.4	3.60	6.00	4.80	4.27
K	8.8	6.3	7.96	7.13	7.55	8.08
R	2.5	11.6	5.53	8.56	7.05	6.14

Los valores teóricos y experimentales se expresan en composición molar (%). No se obtuvieron datos para W, mientras que los datos de C se omiten porque RelB2*Spn* y RelE2*Spn*(His)₆ carecen de este aminoácido.

1.2.4. Determinación de la estructura tridimensional del complejo RelBE2*Spn* por cristalografía de rayos X

La estructura tridimensional del complejo RelBE2*Spn* se resolvió por el método de reemplazo molecular utilizando como modelo la estructura de RelBE2*Spn* con Se-Met, obtenida previamente por el método de difracción anómala múltiple. Los cristales obtenidos de RelBE2*Spn* con Se-Met, del grupo espacial C2, difractaron a una resolución de 3.0 Å. Una vez resuelta esta estructura se obtuvieron cristales de RelBE2*Spn* sin Se-Met, que difractaron a una resolución de 2.5 Å, y se resolvió la estructura del complejo nativo por reemplazo molecular ya que ambas estructuras (con y sin Se-Met) eran prácticamente idénticas. En la unidad asimétrica cristalográfica se observaron un dímero RelB-RelE y un trímero RelB₂-RelE. Examinando los contactos entre las moléculas de la unidad asimétrica y sus moléculas vecinas se observó que un dímero RelB-RelE está contactando con otro dímero igual, y el trímero RelB₂-RelE contacta con otro trímero vecino. Por lo tanto, en la celda del cristal están presentes un heterotetrámero y un heterohexámero. El heterohexámero podría estar mejor acoplado ya que presenta un 60% de superficie escondida como consecuencia de la asociación, mientras que el heterotetrámero presenta un 47%.

En el heterotetrámero las antitoxinas se asocian en dímeros formando una estructura con forma de V. Las dos moléculas de antitoxina RelB2*Spn* contactan por sus regiones N-terminal formando el vértice y en el extremo N-terminal se asocian formando una lámina β antiparalela rodeada de hélices α , configurándose así un motivo RHH, característico en dominios de unión de proteínas a DNA. Las toxinas RelE2*Spn* contactan cada una de ellas con una antitoxina, los contactos se establecen entre la hélice $\alpha 2$ de la antitoxina y la región de cadenas β consecutivas ($\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) de la toxina (Figura 36A).

El heterohexámero está formado por la asociación de dos heterotrímeros RelB₂-RelE, donde cada una de las moléculas de antitoxinas presenta una conformación diferente (Figuras 36B y 37). En uno de los protómeros de antitoxina se distinguen 3 hélices α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) de un tamaño similar, mientras que en la otra subunidad que forma el dímero, la hélice $\alpha 2$ es de mayor longitud y la hélice $\alpha 3$ de menor longitud. Las antitoxinas en este oligómero contactan a través de la región N-terminal formando un dímero, en el que extremos N-terminales de cada uno de los protómeros se asocian formando un motivo RHH. De este modo el heterohexámero incluiría dos motivos RHH pudiendo contactar con cada uno de ellos con una secuencia específica dentro de su DNA diana.

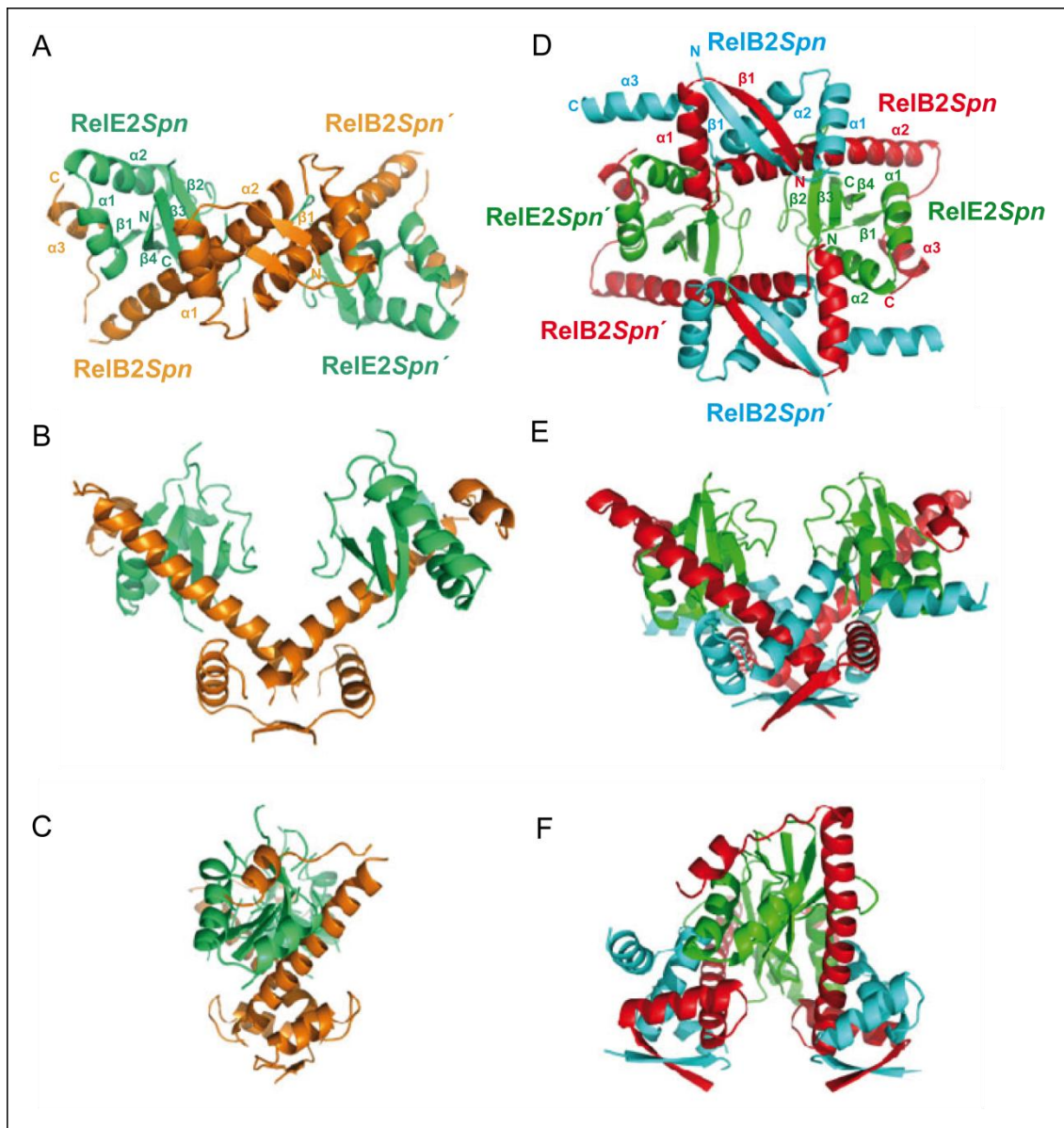


Figura 36. Estructura tridimensional del complejo RelBE2Spn. (A-C) Heterotetrámero RelB₂-RelE₂ en tres vistas diferentes. La antitoxina RelB2Spn se representa en marrón y la toxina RelE2Spn en verde. Se indican los elementos de estructura secundaria hélices α y cadenas β . (D-F) Heterohexámero (RelB₂-RelE₂)₂. Un monómero de antitoxina se representa en rojo y otro en azul, la toxina se representa en verde. Se indican los elementos de estructura secundaria hélices α y cadenas β .

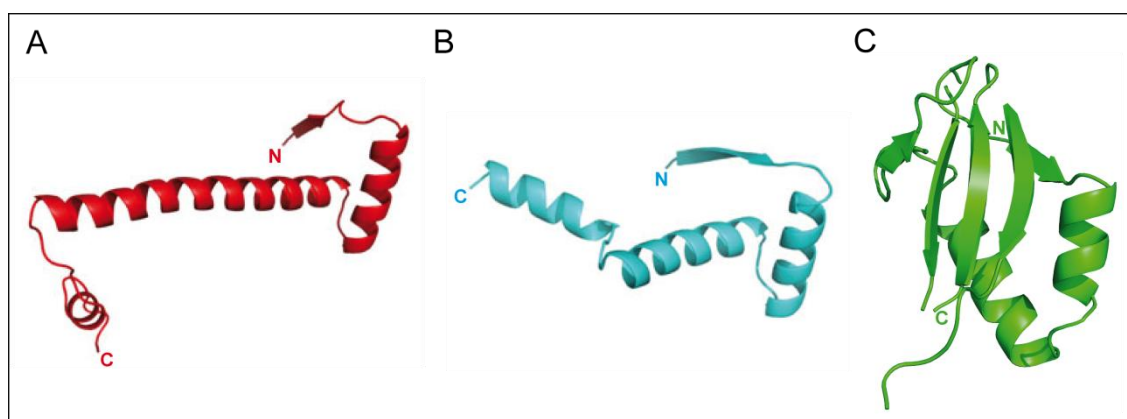


Figura 37. Estructura tridimensional de cada uno de los monómeros que forman parte del heterohexámero $(\text{RelB}_2\text{-RelE})_2$. (A y B) Monómeros de antitoxina *RelB2Spn* con dos conformaciones diferentes. (C) Monómero de toxina *RelE2Spn*.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL COMPLEJO ReIBE2*Spn* Y DE LA ANTITOXINA ReIB2*Spn*

Los sistemas TA de tipo II, como se ha descrito en la Introducción, están organizados en un operón en el que el gen de la antitoxina suele preceder al gen de la toxina. Tanto la antitoxina como el complejo TA se unen al operador de la región promotora del operón, pero el complejo lo hace de una forma más estable que la antitoxina sola. El complejo TA interacciona con el DNA vía el dominio de unión a DNA de la antitoxina y, como consecuencia, la transcripción del operón se autoregula (Gerdes, *et al.*, 2005).

En este Capítulo se describen las diferentes aproximaciones experimentales que nos han permitido: 1) Determinar la capacidad de unión a DNA de la antitoxina RelB2*Spn* y del complejo RelBE2*Spn*; 2) Identificar la región operadora a la que se unen ambas proteínas; 3) Definir la estequiometría DNA-proteína tanto para la antitoxina sola como para el complejo RelBE2*Spn*, y 4) Evaluar la capacidad de la antitoxina y del complejo TA para actuar como elementos reguladores del sistema.

2.1. CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE LA ANTITOXINA RelB2*Spn* Y DEL COMPLEJO RelBE2*Spn*: ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

La capacidad de la antitoxina RelB2*Spn* o del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn* para interaccionar con DNA se valoró mediante ensayos de retardo en gel (EMSA). Como DNA diana se utilizó un fragmento de DNA de 256 pb. Este fragmento incluye la región promotora del operón *relBE2Spn*, los sitios de inicio de la transcripción y la traducción y la secuencia Shine-Dalgarno (Figura 38A). El fragmento de DNA (10 nM) se incubó con concentraciones crecientes del complejo RelB2*Spn*-RelE2His₆*Spn* o de la antitoxina His₆RelB2*Spn*. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente y en tampón de unión en presencia de distintas concentraciones de NaCl y de heparina, usado como competidor. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles nativos de PAA al 5%. Los resultados de estos experimentos indicaron que una menor fuerza iónica favorece la formación de los complejos, así como una concentración de heparina entre 5 y 10 µg/ml. En la figura 38 se muestran los resultados de los ensayos de retardo en gel en los que las muestras se incubaron con NaCl 50 mM y heparina 10 µg/ml. Cuando el DNA diana se incubó con el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ (Figura 38B) se observó la presencia de una banda retrasada bien definida, que va apareciendo a medida que aumenta la concentración de proteína empleada, indicando la formación de un único complejo nucleoproteico. Sin embargo, se necesitaron concentraciones mucho más elevadas de antitoxina His₆RelB2*Spn* para detectar la formación de un complejo nucleoproteico (Figura 38D). Además, la unión de las proteínas al DNA es específica ya que al incubarse tanto el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ (Figura 38C) como la antitoxina His₆RelB2*Spn* (Figura

38E) con un DNA inespecífico no se observó la formación de ningún complejo DNA-proteína.

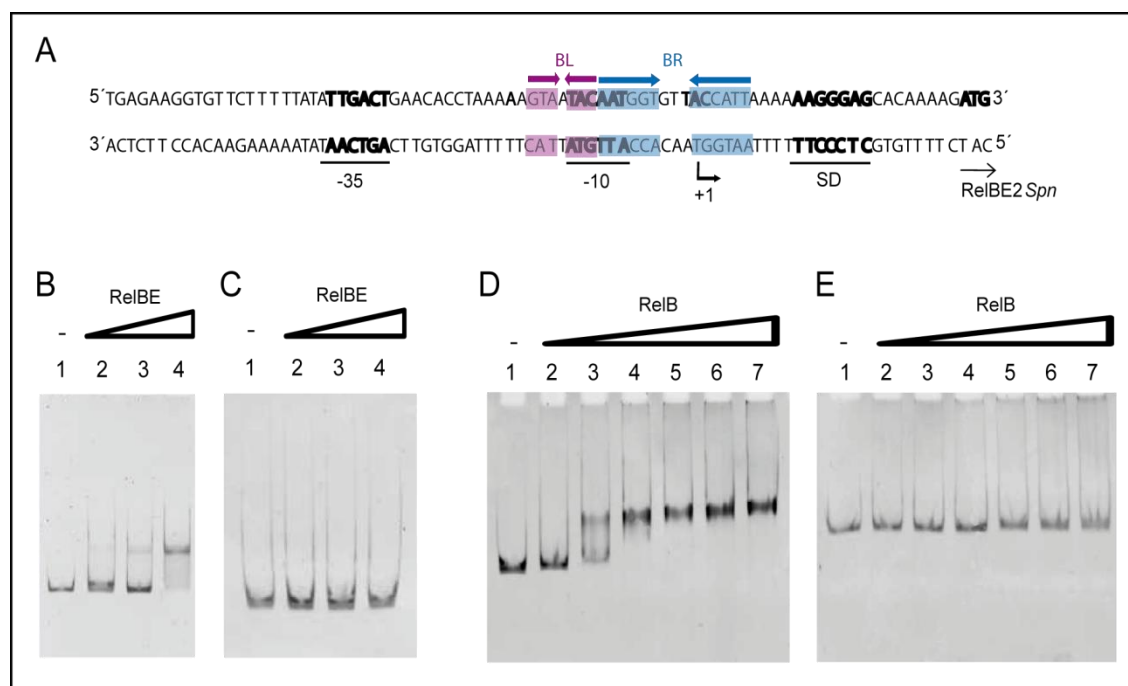


Figura 38. Unión del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ y de la antitoxina His₆RelB2Spn al DNA operador. (A) Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de 256 pb que incluye la región promotora de *relBE2Spn* utilizado en los ensayos de retardo en gel. Se indica el promotor, la secuencia Shine-Dalgarno (SD), el sitio de inicio de la transcripción (+1) y el sitio de inicio de la traducción (ATG). Las flechas y el sombreado en color marcan las repeticiones invertidas localizadas en esta secuencia, denominadas como BL (del inglés "binding left") y BR (del inglés "binding right"). (B) EMSA con DNA de 256 pb (10 nM). El ensayo se realizó en ausencia (calle 1) o en presencia del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ en concentraciones crecientes: 0,2 µM (calle 2); 0,4 µM (calle 3) y 0,9 µM (calle 4). (C) EMSA con DNA inespecífico de 187 pb (10 nM) incubado en ausencia (calle 1) o en presencia de concentraciones crecientes de RelB2Spn-RelE2SpnHis₆: 0,2 µM (calle 2); 0,4 µM (calle 3) y 0,9 µM (calle 4). (D) EMSA utilizando DNA de 256 pb (10 nM) en ausencia de la antitoxina His₆RelB2Spn (calle 1) o utilizando concentraciones crecientes de antitoxina: 1 µM (calle 2); 2,5 µM (calle 3); 6 µM (calle 4); 8 µM (calle 5); 10 µM (calle 6) y 15 µM (calle 7). (E) EMSA con DNA inespecífico de 187 pb (10 nM) incubado en ausencia (calle 1) o en presencia de concentraciones crecientes de la antitoxina His₆RelB2Spn: 1 µM (calle 2); 2,5 µM (calle 3); 6 µM (calle 4); 8 µM (calle 5); 10 µM (calle 6) y 15 µM (calle 7). Todos los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo en tampón de unión suplementado con 50 mM de NaCl y 10 µg/ml de heparina.

Por otro lado, se realizaron EMSAs con un fragmento de DNA marcado con (γ-P³²)-ATP (199 pb), usándose dos tipos de competidores, heparina, en los ensayos en los que se utilizaba en la reacción el complejo RelBE2Spn o poli (dI-dC) en aquellas mezclas de unión con antitoxina (Figura 39). El patrón de retardo en estos ensayos coincidía con el observado con el fragmento de DNA no radiactivo. Las condiciones utilizadas en estos ensayos con fragmentos

marcados fueron las que se fijaron posteriormente en los experimentos de *footprinting* (ver más adelante).

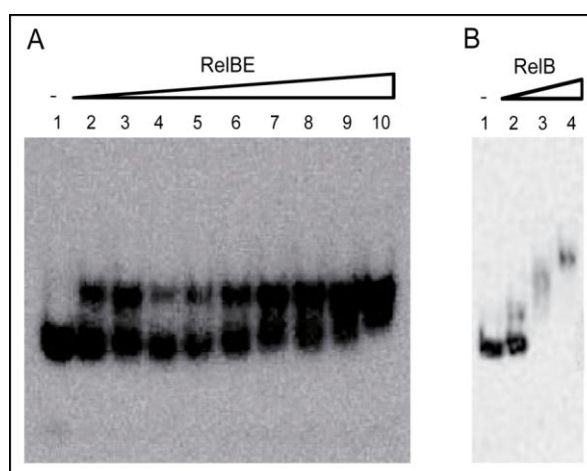


Figura 39. EMSA del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ y His₆RelB2Spn con DNA marcado radiativamente. EMSA con un fragmento de DNA de 199 pb marcado radiativamente (1,8 nM) en ausencia (calle 1) o en presencia de concentraciones crecientes del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ (A): 0,2 μM (calle 2); 0,3 μM (calle 3); 0,4 μM (calle 4); 0,5 μM (calle 5); 0,6 μM (calle 6); 0,7 μM (calle 7); 0,8 μM (calle 8); 0,9 μM (calle 9) y 1 μM (calle 10); incubados en tampón de unión suplementado con 100 mM de NaCl y 10 μg/ml de heparina. (B) EMSA con DNA de 199 pb (1,8 nM) en ausencia (calle 1) o en presencia de concentraciones crecientes de la antitoxina His₆RelB2Spn: 5 μM (calle 2); 8 μM (calle 3) y 10 μM (calle 4); incubados en tampón de unión suplementado con 100 mM de NaCl y 50 ng de poli dI-dC.

Los resultados obtenidos indican que el complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ se une con mayor afinidad al DNA operador que la antitoxina His₆RelB2Spn sola. Resultados similares se ha descrito previamente para otros sistemas TA (Kedzierska, *et al.*, 2007; Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008; Chan, *et al.*, 2011).

2.2. IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN AL DNA DE LA ANTITOXINA RelB2Spn Y DEL COMPLEJO RelBE2Spn: ANÁLISIS MEDIANTE FOOTPRINTING

La inspección de la secuencia entorno a la región promotora del operón relBE2Spn mostró la presencia de dos repeticiones invertidas de 6 pb y 3 pb que solapan con la región -10 del promotor y con el sitio de inicio de la transcripción (Figura 38). Este tipo de repeticiones, comunes en las regiones promotoras de operones TA, se han identificado como secuencias a las cuales se unen, tanto las antitoxinas como los complejos TA. (Mattison, *et al.*, 2006; Kedzierska, *et al.*, 2007; Monti, *et al.*, 2007; Li, *et al.*, 2008; Overgaard, *et al.*, 2009; Chan, *et al.*, 2011). Con el objetivo de identificar el sitio de unión tanto del complejo

RelB2*Spn* como de la antitoxina RelB2*Spn* se realizaron ensayos de *footprinting*. Esta técnica se basa en la medida de la accesibilidad al DNA que presentan un conjunto de agentes. Estos agentes pueden modificar las bases del DNA o ser capaces de cortar el esqueleto del DNA. Para la realización del presente trabajo se eligieron la DNasa I, que produce una digestión enzimática del DNA, y el radical hidroxilo, agente químico capaz de realizar el corte del DNA con una alta resolución. En estos ensayos se utilizó un DNA de 199 pb marcado en uno u otro de sus extremos 5' con (γ -P³²)-ATP (cadena codificante o no codificante). Este fragmento de DNA incluía la región promotora del operón así como las secuencias repetidas invertidas localizadas alrededor de la región de iniciación de la transcripción.

2.2.1. *Footprinting* con DNasa I

Las principales ventajas del uso de la enzima DNasa I son: i) la actividad endonucleasa, ya que digiere el enlace fosfodiéster en DNA mono- y bi-catenario de forma inespecífica en presencia de iones Mg²⁺ y ii) su tamaño medio (masa molecular ~39 kDa), de manera que las regiones de DNA reconocidas específicamente por una proteína, son inaccesibles para la DNasa I y quedan protegidas de su actividad.

En los ensayos de *footprinting* con DNasa I se incubaron concentraciones crecientes del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ o de la antitoxina His₆RelB2*Spn* con el fragmento de DNA de 199 pb marcado radiativamente. Tras la digestión con DNasa I, las reacciones se analizaron en geles de PAA al 8% con 7 M de urea junto a las reacciones de secuenciación del mismo fragmento. El patrón de protección frente a la digestión con DNasa I obtenido con el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ fue indistinguible del patrón obtenido con la antitoxina (His)₆RelB2*Spn*, así como la protección de la cadena codificante y de la cadena no codificante con ambas proteínas (Figuras 40 y 41). Sin embargo, la protección del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ se detectó cuando se utilizaron las concentraciones 0,4 μ M, 0,8 μ M y 1 μ M, mientras que la protección de la antitoxina se detectó con 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M y 30 μ M. La región protegida por las proteínas cubre una región de 26 pb, que se extiende desde la posición -20 a +6 (con respecto a la posición +1, sitio de inicio de la transcripción), e incluye la caja -10 y el sitio de inicio de la transcripción así como las repeticiones invertidas BL y BR (Figura 38A). En los geles de secuenciación (Figuras 40 y 41) no se observaron bandas de hiperexposición en ninguna de las cadenas, indicando que la unión del complejo o la antitoxina, en las condiciones utilizadas no distorsionan la estructura del DNA.

Las imágenes de los geles de secuencia se analizaron mediante densitometrías con el objetivo de hacer un análisis más refinado de la región protegida tras la digestión con DNasa I. La densitometría de la imagen del gel permite detectar la densidad óptica de cada uno de los puntos y analizando los

valores con el software QuantityOne se obtiene como resultado una serie de picos, que corresponden cada uno con una banda del gel. La comparación de los resultados obtenidos a partir de las densitometrías de la muestra correspondiente al DNA libre con la del DNA acomplejado con la proteína permitió definir la región de interacción de la antitoxina y del complejo TA con el DNA, pues en las zonas de contacto se observa una disminución de la densidad óptica (Figuras 40 y 41).

2.2.2. *Footprinting* con radical hidroxilo

El radical hidroxilo corta el DNA extrayendo un átomo de hidrógeno de las deoxirribosas del esqueleto del DNA y no presenta preferencia de bases o secuencias (Tullius, *et al.*, 1987). La digestión química del DNA generada por el radical hidroxilo permite identificar la zona del esqueleto del DNA contactada por la proteína.

El DNA marcado radiactivamente en el extremo 5' de una u otra cadena (codificante o no codificante), se incubó con concentraciones crecientes del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ o de la antitoxina His₆RelB2*Spn*, y tras la reacción con el radical hidroxilo, las muestras se analizaron en geles de PAA al 8% con 7 M de urea junto a la reacción de secuenciación del mismo fragmento. Los resultados de los *footprinting* con radical hidroxilo y las densitometrías de las correspondientes imágenes se muestran en las figuras 42 y 43. Al igual que el patrón de protección frente a digestión con DNasa I, la protección frente al radical hidroxilo fue indistinguible entre el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ y la antitoxina His₆RelB2*Spn*, pero sí existieron diferencias en la protección de la cadena codificante y de la cadena no codificante. El complejo y la antitoxina en la cadena codificante protegieron tres regiones en el DNA, cada una de las cuales incluye tres bases (Figuras 42A y 43A). En la cadena no codificante la protección frente a radical hidroxilo afecta a tres regiones diferentes que están desplazadas hacia el extremo 3' (Figuras 42B y 43B).

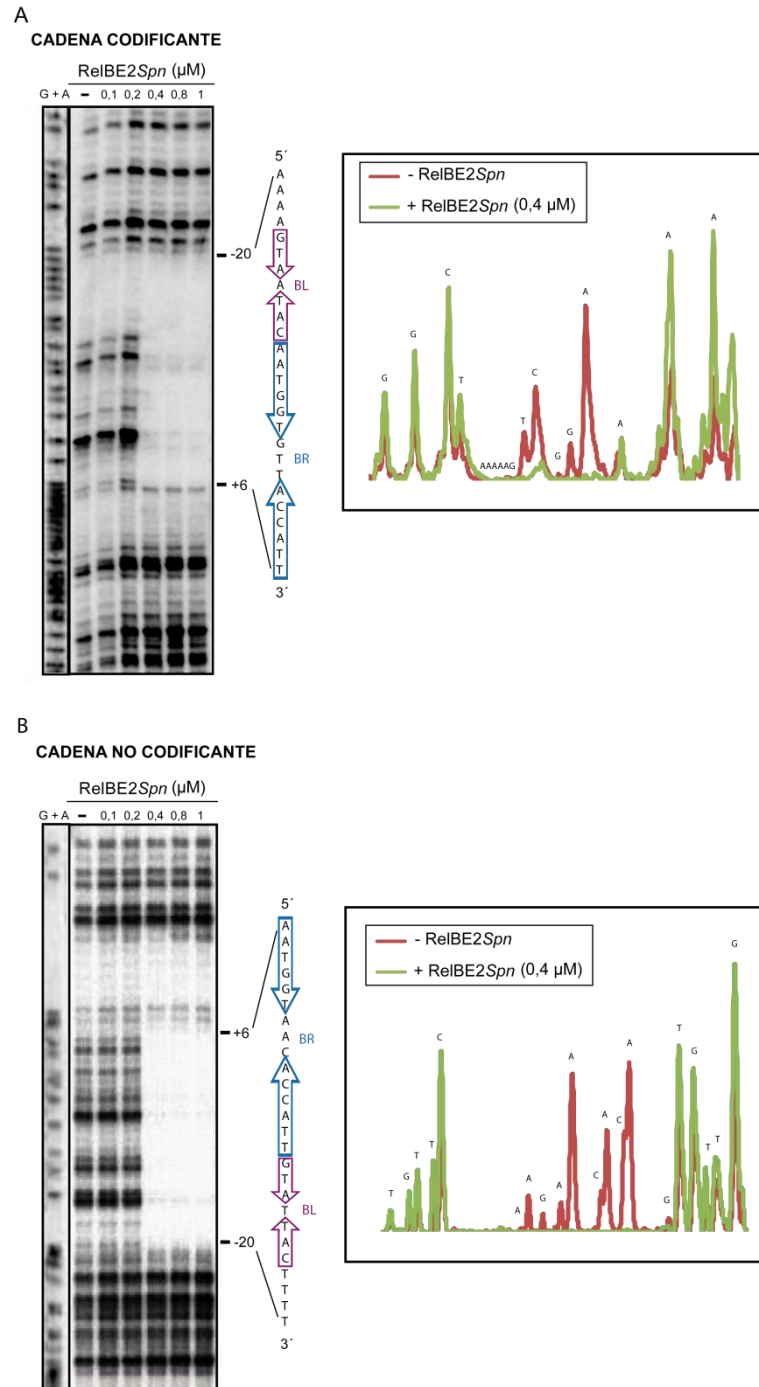


Figura 40. Ensayos de footprinting con DNasa I del complejo RelBE2Spn unido a DNA. Revelado de los geles de PAA al 8% con 7M de urea junto con los perfiles densitométricos. El fragmento de DNA de 199 pb (1,8 nM) fue marcado radiativamente en el extremo 5' de la cadena codificante (A) y de la no codificante (B), e incubado en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes del complejo RelBE2Spn: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1 μM . Tras la digestión con DNasa I, las reacciones se analizaron en geles de PAA junto a las reacciones de secuenciación del mismo fragmento (G+A). Junto a la imagen del gel se indica la secuencia protegida frente a DNasa I, y en ella se marcan las repeticiones invertidas BL y BR. En los perfiles densitométricos se superponen los perfiles del DNA libre (rojo) y el perfil del DNA unido a la proteína (verde).

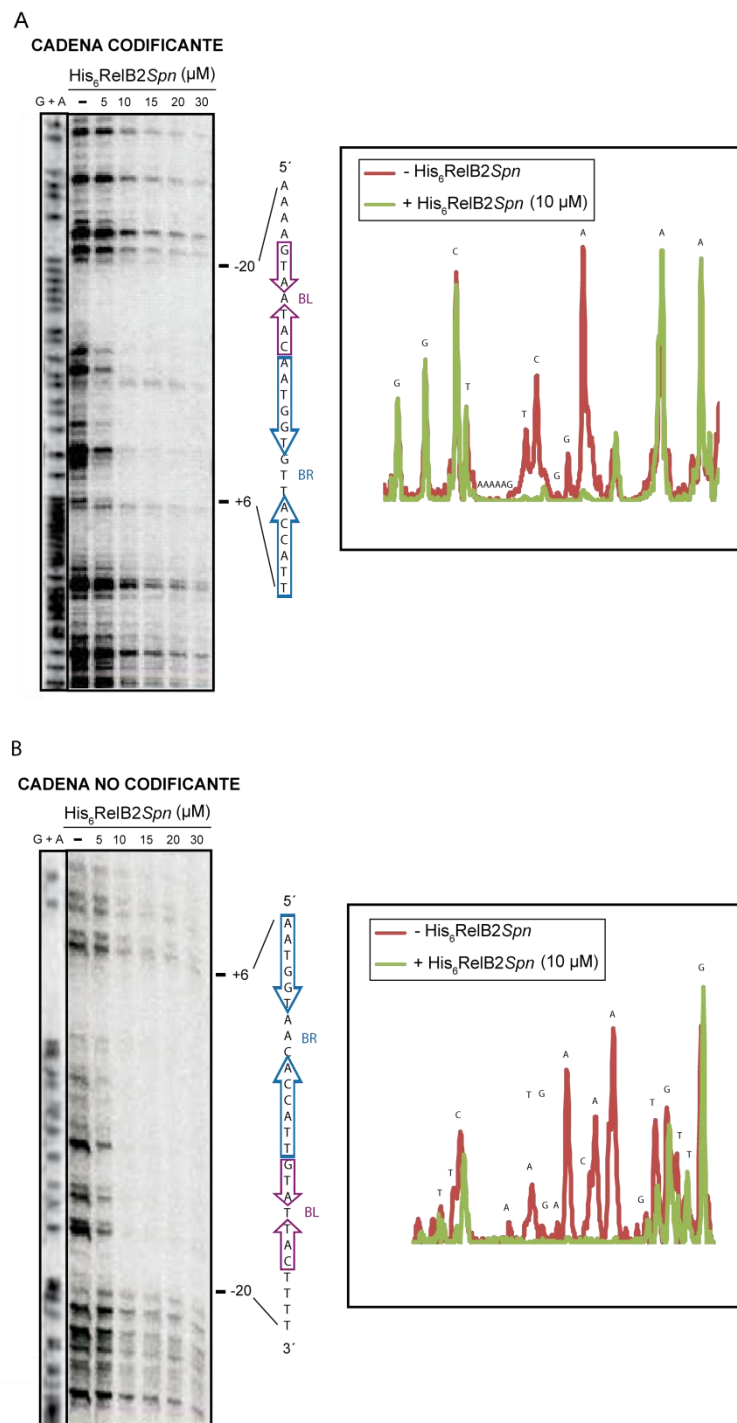


Figura 41. Ensayos de footprinting con DNasa I de la antitoxina RelB2 *Spn* unida a DNA. Revelado de geles de PAA al 8% con 7M de urea junto con los perfiles densitométricos. El fragmento de DNA de 199 pb (1,8 nM) fue marcado radiativamente en el extremo 5' de la cadena codificante (A) y de la no codificante (B), e incubado en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la antitoxina RelB2 *Spn*: 5, 10, 15, 20 y 30 μ M. Tras la digestión con DNasa I, las reacciones se analizaron en geles de PAA junto a las reacciones de secuenciación del mismo fragmento (G+A). Junto a la imagen del gel se indica la secuencia protegida frente a DNasa I, y en ella se marcan las repeticiones invertidas BL y BR. En los perfiles densitométricos se superponen los perfiles del DNA libre (rojo) y el perfil del DNA unido a la proteína (verde).

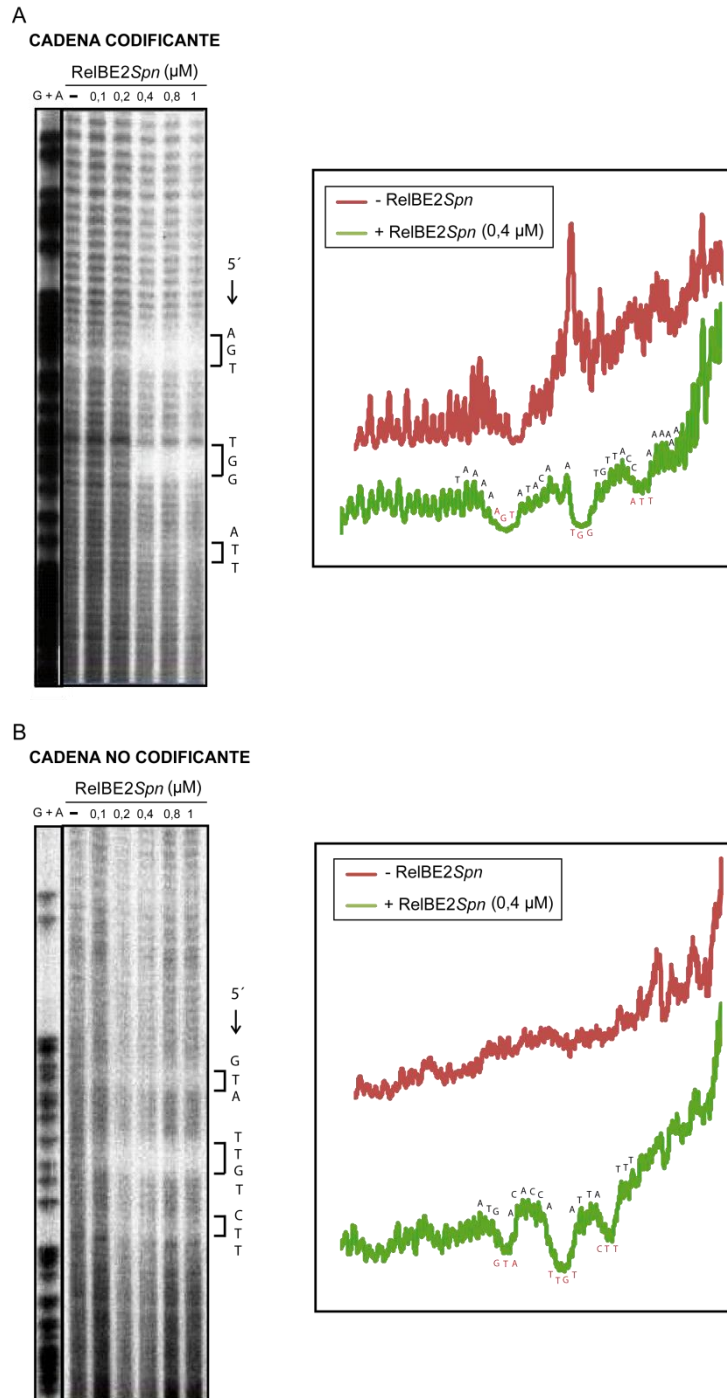


Figura 42. Ensayos de footprinting con radical hidroxilo del complejo RelBE2Spn unido a DNA. Revelado de los gels de PAA al 8% con 7M de urea junto con los perfiles densitométricos. El fragmento de DNA de 199 pb (3,6 nM) fue marcado radiactivamente en el extremo 5' de la cadena codificante (A) y de la no codificante (B), e incubado en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes del complejo RelBE2Spn: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1 μM. Tras el ataque con radical hidroxilo, las reacciones se analizaron en gels de PAA junto a la reacción de secuenciación del mismo fragmento (G+A). Junto a la imagen del gel se indican las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por radical hidroxilo. En los perfiles densitométricos se representa el perfil del DNA libre (rojo) y el perfil del DNA unido a la proteína (verde).

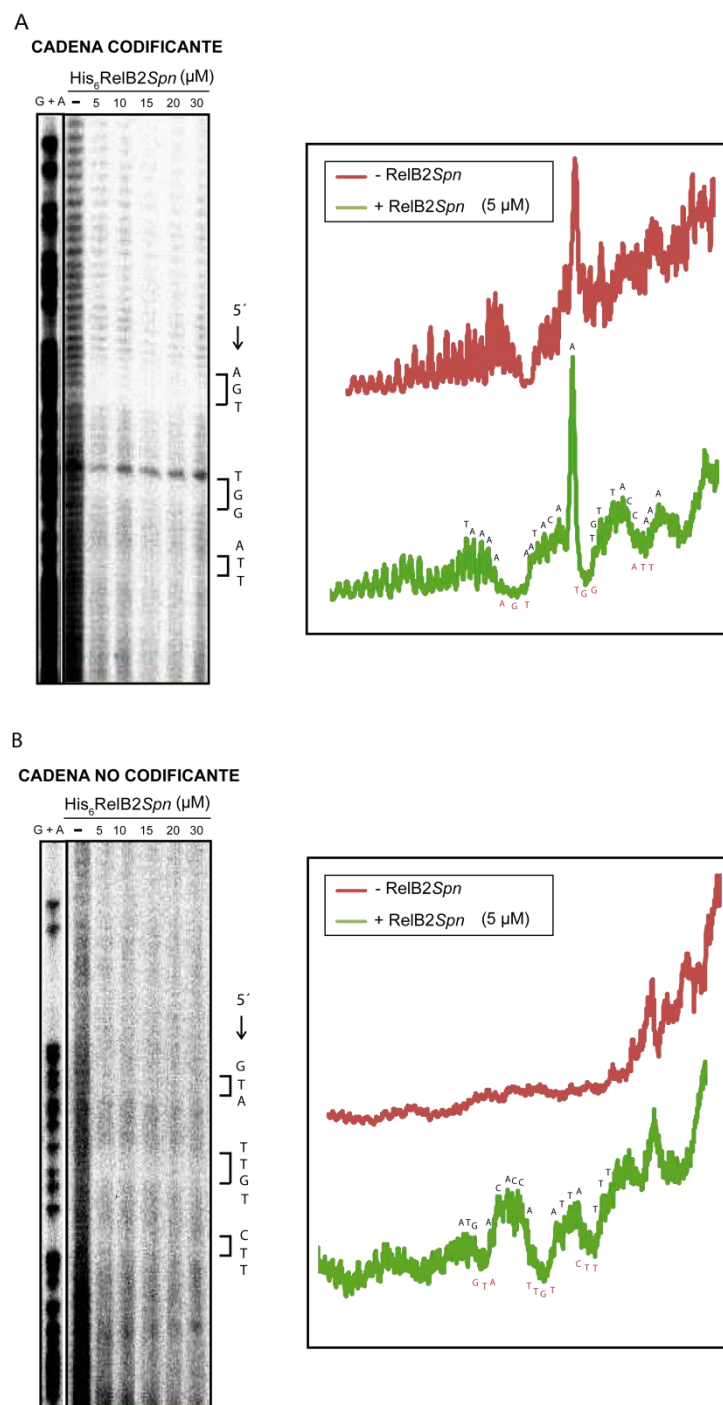


Figura 43. Ensayos de footprinting con radical hidroxilo de la antitoxina RelB2Spn unida a DNA. Revelado de los geles de PAA al 8% con 7M de urea junto con los perfiles densitométricos. El fragmento de DNA de 199 pb (3,6 nM) fue marcado radiactivamente en el extremo 5' de la cadena codificante (A) y de la no codificante (B), e incubado en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la antitoxina RelB2Spn: 5, 10, 15, 20 y 30 μM. Tras el ataque con radical hidroxilo, las reacciones se analizaron en geles de PAA junto a la reacción de secuenciación del mismo fragmento (G+A). Junto a la imagen del gel se indican las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por radical hidroxilo. En los perfiles densitométricos se representa el perfil del DNA libre (rojo) y el perfil del DNA unido a la proteína (verde).

En la figura 44 se resumen, sobre DNA lineal de doble cadena, los resultados obtenidos en los *footprintings* usando DNasa I y radical hidroxilo.

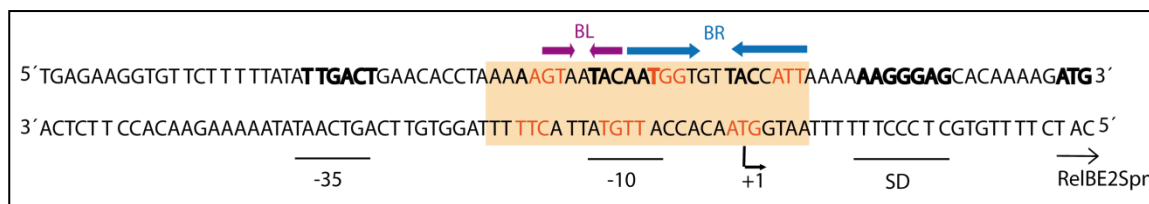


Figura 44. Esquema de las protecciones observadas frente a DNasa I y radical hidroxilo en el DNA diana de 199 pb en presencia del complejo RelBE2*Spn* y la antitoxina RelB2*Spn*. El recuadro naranja indica la protección frente a DNasa I y las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por radical hidroxilo se muestran en color naranja. Se indica el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y el sitio de inicio de la traducción (ATG). Las flechas marcan las repeticiones invertidas localizadas en esta secuencia, denominadas como BL y BR.

2.3. ESTADO DE OLIGOMERIZACION Y ESTEQUIOMETRIA DE LOS COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS RelBE2*Spn*-DNA Y RelB2*Spn*-DNA

Las técnicas de UA y de EMN fueron las aproximaciones experimentales empleadas para analizar las características de asociación de las proteínas con su DNA diana. Se seleccionó como DNA sustrato un fragmento de DNA de 30 pb que incluía los sitios de unión de RelBE2*Spn* y RelB2*Spn*, identificados previamente mediante ensayos de *footprinting* (Figura 45). Este fragmento de DNA contiene las repeticiones invertidas BL y BR, la caja -10 y el sitio de inicio de la transcripción.

2.3.1. Estado de oligomerización del complejo RelBE2*Spn* unido a DNA mediante ensayos de ultracentrifugación analítica

En un primer paso, se establecieron las condiciones para la generación de complejos nucleoproteicos, complejos que se detectaron utilizando ensayos de retardo en gel. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ que se incubaron en tampón de unión en presencia o ausencia del DNA de 30 pb (400 nM). En estos EMSAs (Figura 45) se detectó una banda retrasada bien definida a concentraciones bajas de proteína (0,9 µM), banda que aumentaba de intensidad a medida que aumentaba la concentración de complejo, alcanzándose una completa unión al DNA a partir de 4 µM de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆.

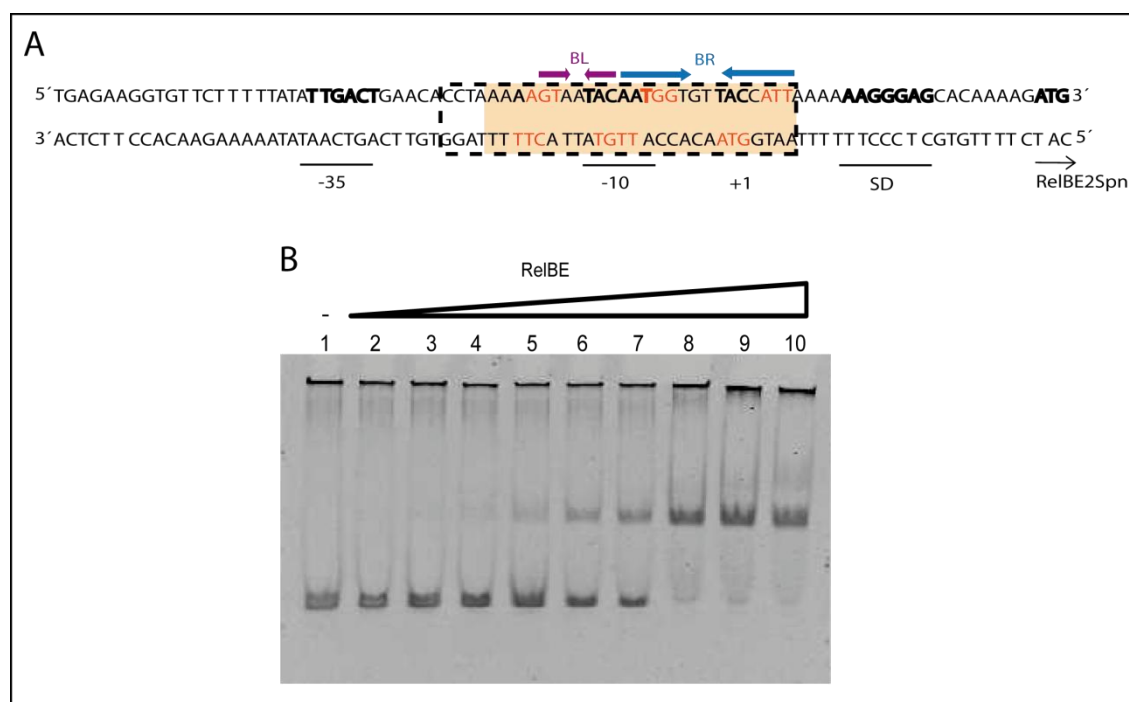


Figura 45. Ensayo de EMSA utilizando como DNA diana un fragmento de 30pb. (A) Secuencia de nucleótidos de los elementos reguladores del operon *relBE2Spn*. La línea discontinua delimita la secuencia del fragmento de 30 pb utilizado para los ensayos de ultracentrifugación analítica y espectrometría de masas nativa. Este fragmento incluye las 26 pb que se observaron protegidas en los ensayos de *footprinting* (el recuadro naranja indica las bases protegidas frente a DNasa I y las bases resaltadas en naranja indican la protección frente a radical hidroxilo). Se indica el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y el sitio de inicio de la traducción (ATG). Las flechas marcan las repeticiones invertidas BL y BR. (B) EMSA con un fragmento de DNA de 30 pb (400 nM) incubado en ausencia (calle 1) o en presencia de concentraciones crecientes del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆: 0,2 μM (calle 2); 0,4 μM (calle 3); 0,9 μM (calle 4); 1,2 μM (calle 5); 1,6 μM (calle 6); 2 μM (calle 7); 4 μM (calle 8); 8 μM (calle 9) y 16 μM (calle 10), en tampón de unión suplementado con 50 ng de poli dI-dC y 50 mM de NaCl.

Muestras similares a las utilizadas en los EMSAs, pero con una concentración mayor de DNA de 30 pb (1 μM) y sin competidor inespecífico, se mezclaron con diferentes concentraciones del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ (0,5 μM, 1 μM y 5 μM) y se analizaron mediante velocidad de sedimentación. La masa molecular de este fragmento de DNA de 30 pb (19.800 Da) es significativamente menor que la masa molecular del heterohexámero (60.000 Da) en solución, lo que nos permitió diferenciar ambas moléculas en estos ensayos.

Los resultados indicaron que el DNA presentaba un coeficiente de sedimentación de $S_{20,w}$ de $2,6 \pm 0,1$ S (Figura 46, línea negra). El perfil de sedimentación de las mezclas de DNA-RelBE2Spn mostró un único pico con un coeficiente de sedimentación de $S_{20,w}$ de $5,1 \pm 0,1$ S cuando se utilizó 5 μM del complejo RelB2Spn-RelE2SpnHis₆ (Figura 46, línea azul). Sin embargo, a concentraciones menores se observó un comportamiento bifásico, obteniéndose

dos picos separados: el pico con un coeficiente de sedimentación menor correspondió al DNA y el otro pico al complejo DNA-proteína (Figura 46, líneas violeta y verde). No se observaron coeficientes de sedimentación mayores a medida que aumentó la concentración del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆, descartando la formación de complejos nucleoproteicos de mayor tamaño, lo que concuerda con los resultados de los EMSAs (Figura 45). Como control se incluyó en el ensayo de VS el complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ sin DNA (20 µM). El perfil de sedimentación (Figura 46, línea discontinua) fue similar al obtenido en experimentos previos (apartado 2.3.2 del Capítulo 1), aunque se observó una menor proporción de heterotrímero, quizás debido a la reducción de la fuerza iónica del tampón en estos ensayos. Para estudiar la asociación del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆ con el DNA, se realizaron ensayos de ES empleando las muestras que ya habían sido analizadas por VS. El análisis del DNA libre mostró una única especie de sedimentación con una masa molecular de 19.800 Da. Los datos experimentales de las mezclas DNA-proteína se ajustaron a un modelo de varias especies y el resultado, usando la concentración más elevada (5 µM), mostró que el complejo nucleoproteico hexámero RelB2*Spn*-RelE2*Spn*His₆:DNA en una relación 1:1 era la especie mayoritaria en la muestra, aunque también se detectó una pequeña proporción de material no unido, que podría ser DNA o proteína libre (Figura 46). Por lo tanto, el complejo nucleoproteico parece estar formado por un heterohexámero de RelB2*Spn* y una molécula de DNA.

2.3.2. Estequiometría de los complejos nucleoproteicos RelB2*Spn*-DNA y RelB2*Spn*-DNA

Los ensayos de EMN permitieron definir las propiedades de la interacción entre las proteínas y su DNA diana; el estado de oligomerización de los complejos proteína-DNA, y la estequiometría de dichos complejos.

Para analizar la interacción DNA-RelB2*Spn* se mezcló la antitoxina (His)₆RelB2*Spn* con el DNA de 30 pb, usando una relación molar 5:1 proteína:DNA. En el espectro de masas de esta mezcla se detectaron diferentes series de iones (Figura 47A). El DNA libre pudo ser asignado a la serie de iones alrededor del rango 2000-2600 m/z, la antitoxina libre a la serie de iones alrededor de 1700-2000 m/z, mientras que la serie de iones en el rango 3200-3800 m/z puede corresponder con un dímero de antitoxina unido a una molécula de DNA. La alta proporción de antitoxina y DNA libre en comparación con el complejo DNA-antitoxina indicó una interacción débil del dímero de antitoxina con el DNA sustrato. Tras aumentar la cantidad de antitoxina para obtener una relación molar de 20:1 (proteína: DNA; Figura 47B), se identificaron, además del DNA y la antitoxina libres, diferentes complejos DNA-proteína. Las diferentes series de iones correspondieron a un dímero de antitoxina unido al DNA con una

estequiometría de 1:1 y dímeros de antitoxina unidos al DNA con una estequiometría de 2:1 y 3:1.

La interacción del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ unido a su DNA diana también se analizó mediante EMN. El perfil del espectro de masas de las mezclas RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆-DNA, usando una relación molar proteínas:DNA de 10:1 (Figura 47C), mostró una serie de iones mayoritaria en el rango de 4200-5200 m/z que se pudo asignar a un heterohexámero (RelB2*Spn*)₂-(RelE2His₆*Spn*)₂-(RelB2*Spn*)₂ unido a una molécula de DNA. No se detectó DNA libre, pero sí se observó antitoxina libre, lo que indicó que todo el heterohexámero se encuentra acomplejado con el DNA.

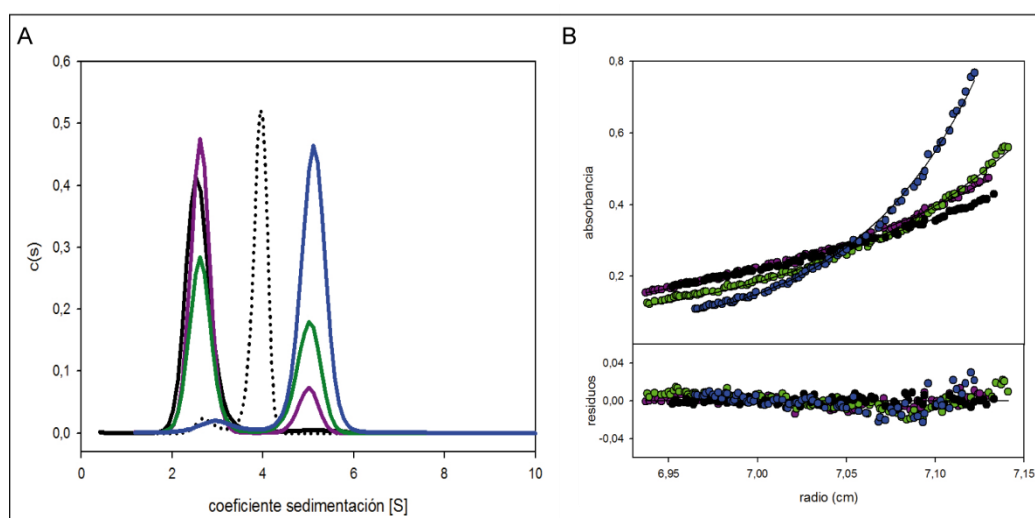


Figura 46. Ultracentrifugación analítica de los complejos DNA-RelBE2*Spn*. (A) Distribución de coeficientes de sedimentación determinada para un fragmento de DNA de 30 pb (1 μM, línea negra), 20 μM del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ (línea discontinua) y mezclas de proteína-DNA conteniendo 1 μM de DNA y diferentes concentraciones de RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆: 0,5 μM (línea violeta), 1 μM (línea verde) y 5 μM (línea azul). (B) Gradientes de equilibrio de sedimentación de un fragmento de DNA de 30 pb en ausencia (círculos negros) y en presencia del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*(His)₆ en concentraciones crecientes (0,5 μM, círculos violetas; 1 μM, círculos verdes; y 5 μM, círculos azules). Los círculos representan los datos experimentales y la línea continua es el mejor ajuste a un modelo de varias especies.

2.4. Caracterización de RelB2*Spn* y RelBE2*Spn* como elementos reguladores en la transcripción del operón *relBE2Spn*

Para correlacionar la capacidad de unión del complejo RelBE2*Spn* y de la antitoxina RelB2*Spn* al DNA operador con la capacidad de regulación transcripcional del operón *relBE2Spn*, se construyeron una serie de plásmidos que contienen diferentes regiones del operón *relBE2Spn* fusionadas transcripcionalmente con el gen *lacZ*, que codifica el enzima β-galactosidasa (ver apartado 9.1. de Métodos). Los ensayos de regulación transcripcional se realizaron tanto en *cis*, con los dos elementos reguladores (secuencia operadora y genes *relB2Spn* o *relBE2Spn*) clonados en el mismo plásmido, como en *trans*,

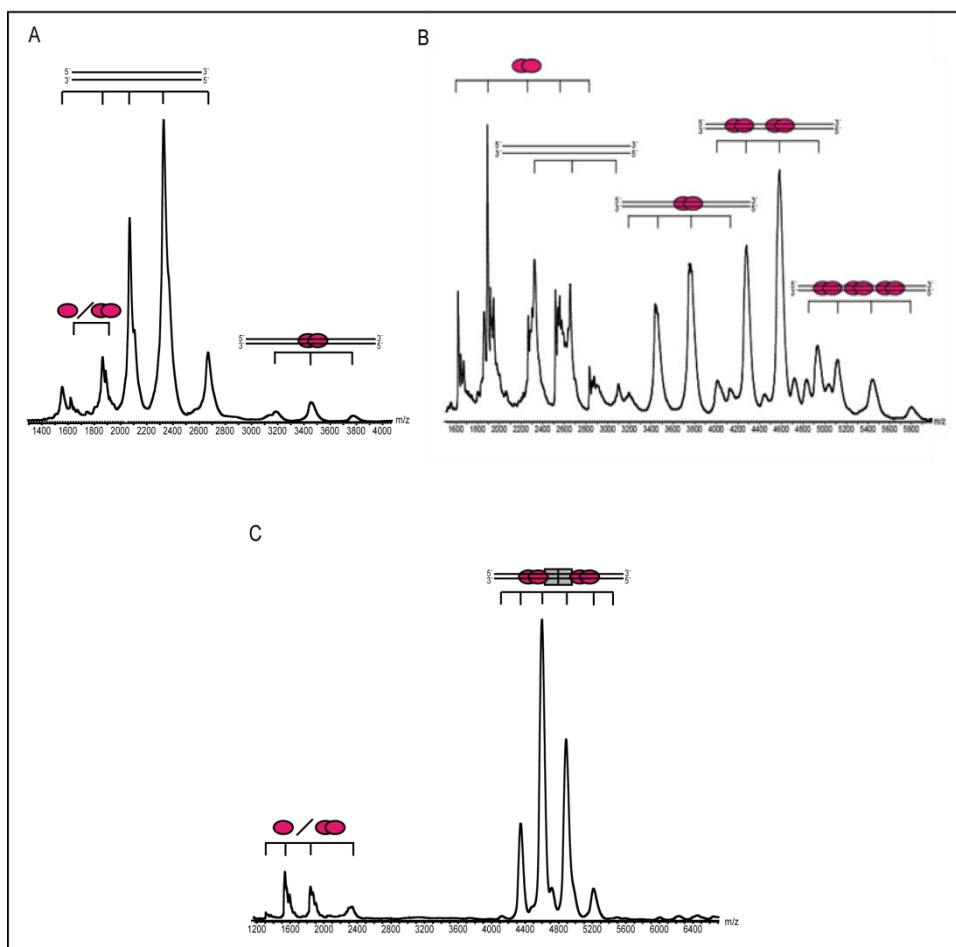
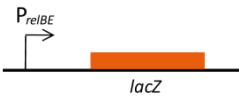
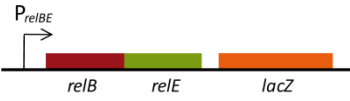
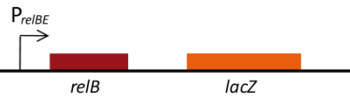


Figura 47. Perfiles de espectrometría de masas nativa de la antitoxina y del complejo TA unidos a DNA. (A) Espectro de masas de la mezcla *His₆RelB2Spn*:DNA a una relación molar de 5:1 (*His₆RelB2Spn* 10 μ M). (B) Espectro de masas de la mezcla *His₆RelB2Spn*:DNA a una relación molar de 20:1 (*His₆RelB2Spn* 20 μ M). (C) Espectro de masas de *RelB2Spn-RelE2SpnHis₆*:DNA a una relación molar de 10:1 (*RelB2Spn-RelE2SpnHis₆* 10 μ M). El monómero de antitoxina *RelB2Spn* se representa con una elipse rosa, el monómero de toxina *RelE2Spn(His₆)* con un cuadrado gris y el fragmento de DNA de 30 pb con dos líneas paralelas. La combinación apropiada de elipses, cuadrados y líneas paralelas indica su presencia en cada complejo.

en los que cada elemento se encuentra localizado en plásmidos diferentes.

Los valores de actividad β -galactosidasa obtenidos en los diferentes ensayos se detallan en la figura 48. Los resultados mostraron que la expresión de la antitoxina, tanto en *cis* como en *trans*, produjo una ligera reducción de los niveles de actividad β -galactosidasa. Sin embargo, esta reducción se incrementó al expresarse el complejo TA. Los niveles de represión transcripcional en ambos casos no son muy elevados, pero las diferencias obtenidas con respecto al control son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 49).

A. Regulación en *cis*

Plásmido		Actividad β -galactosidasa	Nivel de represión
pMP220 P _{relBE}		1065 \pm 64,6	1
pMP220 P _{relBE} -relBE		427 \pm 73,8	2,6
pMP220 P _{relBE} -relB		835 \pm 148	1,3

B. Regulación en *trans*


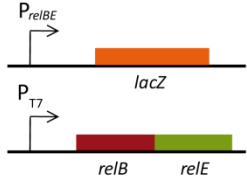
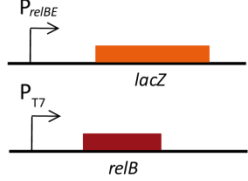
Plásmido		Actividad β -galactosidasa		Nivel de represión	
		- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG
pMP220 P _{relBE} + pET28		1846 \pm 64,3	1900 \pm 59,6	1	1
pMP220 P _{relBE} + pET28relBE		1316 \pm 92,2	968 \pm 36,3	1,56	2
pMP220 P _{relBE} + pET28relB		1791 \pm 43,1	1565 \pm 55,4	1,09	1,29

Figura 48. Análisis de la regulación transcripcional del operón *relBE2Spn* mediante medida de la actividad β -galactosidasa de cultivos de *E. coli* JM109 (DE3) portadora de los plásmidos mostrados. (A) Regulación en *cis*. (B) Regulación en *trans*, en este caso la actividad β -galactosidasa se midió creciendo los cultivos en ausencia o en presencia de 1mM de IPTG. Los valores de actividad β -galactosidasa, expresada en unidades Miller, son el resultado de la media de los valores de cuatro ensayos independientes. El nivel de represión está calculado en relación a la actividad del plásmido utilizado como control.

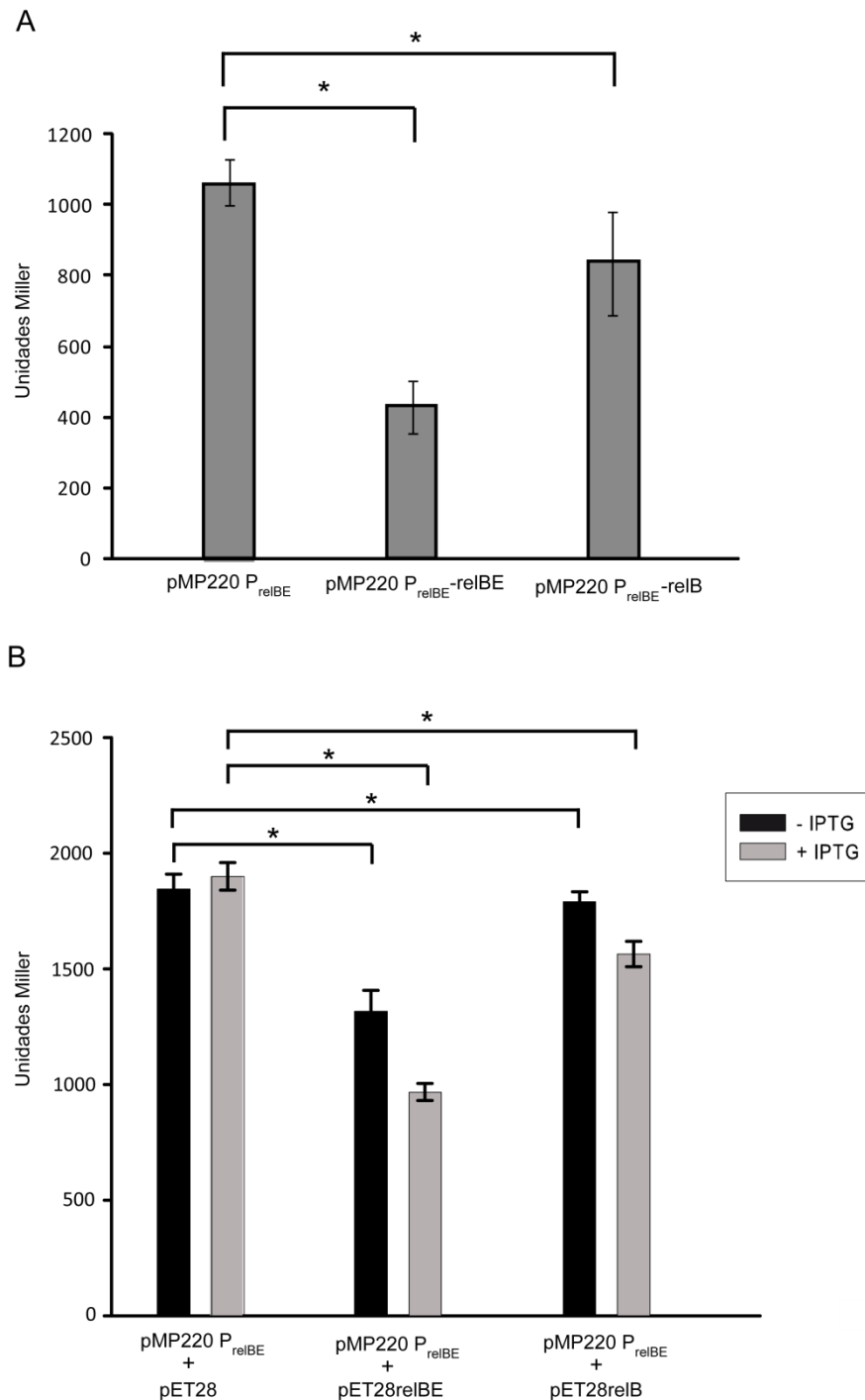


Figura 49. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los experimentos de regulación transcripcional en cis (A) y en trans (B) del operón *relBE2Spn*. Representación de la medida de la actividad β -galactosidasa (unidades Miller) de cultivos de *E. coli* JM109 (DE3) portadora de los plásmidos mostrados. Para analizar la regulación en *trans* se midió la actividad β -galactosidasa creciendo los cultivos en ausencia (barras negras) o en presencia de 1mM de IPTG (barras grises). Los valores de actividad β -galactosidasa son el resultado de la media de los valores de cuatro ensayos independientes. Los asteriscos indican los casos en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), tras realizar una prueba t-Student.

CAPÍTULO 3: PAPEL DE LOS SISTEMAS *ReIBE2Spn* y *YefMYoeBSpn* EN LA BIOLOGÍA DEL PNEUMOCOCO

Como se ha descrito en la Introducción, los sistemas TA cromosómicos pueden estar implicados en diversos procesos de la biología de la bacteria, tales como respuesta al estrés (Christensen, *et al.*, 2003), muerte celular programada (Engelberg-Kulka, *et al.*, 2006) y persistencia y tolerancia a antibióticos (Moyed y Bertrand, 1983; Lewis, 2010), entre otros. En relación a estas funciones, en el presente trabajo se ha analizado el posible papel de los dos sistemas TA de *S. pneumoniae* (RelBE2Spn y YefMYoeBSpn), estudiados en nuestro laboratorio, en cuanto a la respuesta a estrés (ácido y por zinc) (Martin-Galiano, *et al.*, 2005; Bijlsma, *et al.*, 2007; Kloosterman, *et al.*, 2008), competencia, capacidad para formar *biofilms*, y persistencia infectiva.

Los experimentos para determinar la capacidad de formar *biofilms* de las estirpes pneumococicas ensayadas, se realizaron en colaboración con el Dr. Ernesto García y la Dra. Miriam Moscoso, en el CIB de Madrid. Para analizar el papel de RelBE2Spn y YefMYoeBSpn en persistencia infectiva se realizaron una serie de experimentos en el laboratorio de la Dra. Eva Medina, en *Helmholtz Centre for Infection Research* (HZI) de Braunschweig, Alemania, utilizando un modelo de infección *in vitro* y analizando la capacidad de adhesión y la capacidad de invasión de las estirpes bacterianas utilizadas.

3.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CROMOSÓMICOS POR REEMPLAZAMIENTO GÉNICO

Se construyeron mutantes cromosómicos de las estirpes *S. pneumoniae* R61 y *S. pneumoniae* D39 por reemplazamiento génico. En estos mutantes los genes *relB2Spn* y *relE2Spn* o *yefMSpn* y *yoeBSpn* se sustituyeron en el cromosoma por un gen de resistencia a cloramfenicol o kanamicina, respectivamente. Se obtuvieron también dobles mutantes, sustituyendo secuencialmente los genes de ambos sistemas TA por los respectivos marcadores de resistencia (Figura 50). La construcción de estos mutantes se describe en detalle en el apartado 3.6. de Métodos.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES CROMOSÓMICOS

3.2.1. Crecimiento y análisis morfológico de las estirpes silvestres y mutantes en diferentes medio de cultivo

Crecimiento de las estirpes R61 y D39 mutantes y silvestre en medio de cultivo C

La curva de crecimiento de *S. pneumoniae* se caracteriza por presentar las siguientes fases: exponencial, estacionaria y autólisis. La autólisis es una propiedad distintiva de *S. pneumoniae* cuyas células muestran una tendencia a lisarse espontáneamente cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria

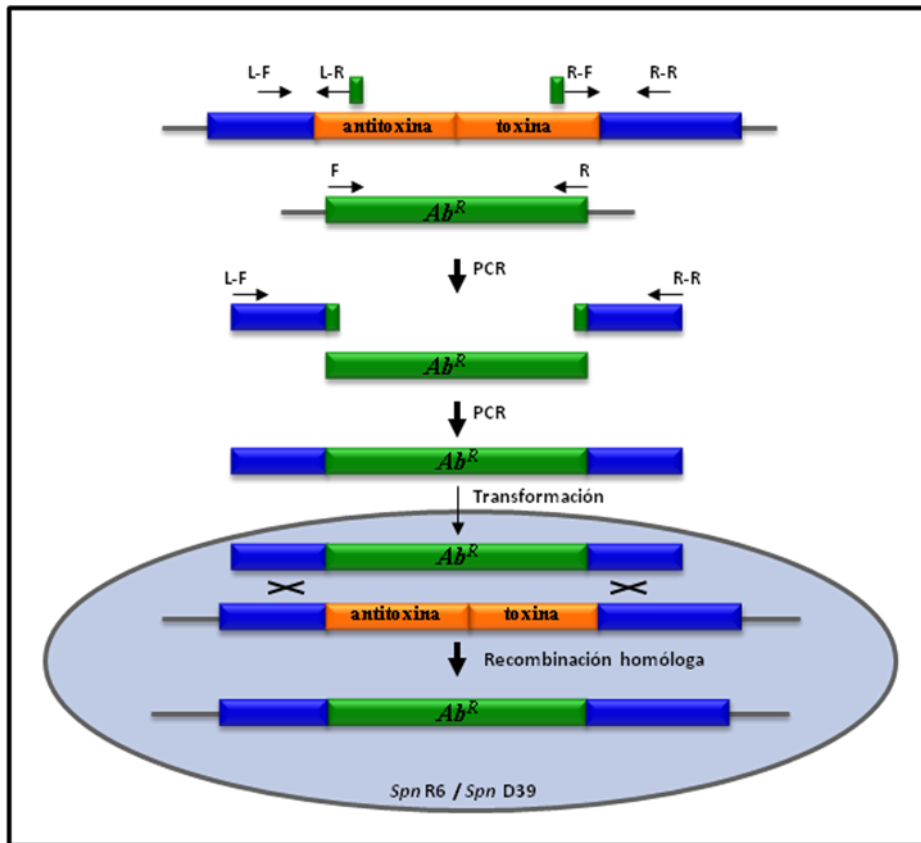


Figura 50. Esquema de la construcción de mutantes cromosómicos de estirpes de pneumococos mediante reemplazamiento génico.

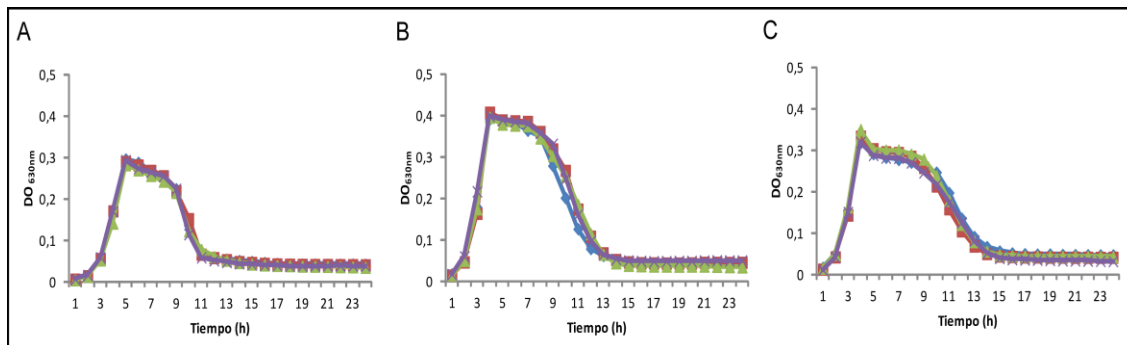


Figura 51. Curvas de crecimiento de las estirpes *S. pneumoniae* R61 y D39 silvestre y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$. Curvas de crecimiento de las estirpes *S. pneumoniae* R61 (A) y D39 (B y C) silvestre y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$, cultivadas a 37°C en medio C (C) y en medio C suplementado con 0,08% de extracto de levadura (A y B). El crecimiento se monitorizó mediante medida de densidad óptica DO_{630} . Se obtuvieron tres valores independientes de cada cultivo y se representó el valor medio. La línea azul representa la estirpe silvestre, la línea roja la estirpe mutante $\Delta relBE2Spn$, la línea verde la estirpe mutante $\Delta yefMyoeBSpn$ y la línea violeta la estirpe doble mutante $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$.

(Giudicelli, *et al.*, 1984). La autólisis juega un papel importante en la infección ya que permite la liberación de factores de virulencia (Martner, *et al.*, 2008).

Se analizaron curvas de crecimiento a 37°C de las estirpes *S. pneumoniae* R61 y D39 silvestres y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ en el medio C y en el medio C suplementado con 0,08% de extracto de levadura. Como se observa en la figura 51, las estirpes mutantes de R61 mostraron unas curvas de crecimiento similares a la de la estirpe silvestre y, de igual modo, no se observaron diferencias de crecimiento en el caso de las estirpes D39. Por lo tanto, la delección de los sistemas *RelBE2Spn*, *YefMYoeBSpn* o ambos no parece afectar al perfil de crecimiento de *S. pneumoniae* en las condiciones ensayadas.

Morfología celular de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes crecidas en medio de cultivo AGCH completo

La morfología celular de la estirpe R61 silvestre y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$, se analizó en cultivos crecidos en medio AGCH completo a 37°C. Una vez que alcanzaron una $DO_{650} = 0,6$ las células se visualizaron por microscopía de contraste de fases. En las condiciones de crecimiento utilizadas no se observaron diferencias en morfología. En todos los cultivos analizados las células bacterianas tenían una forma lanceolada con un tamaño similar y se disponían en diplos o cadenas (Figura 52).

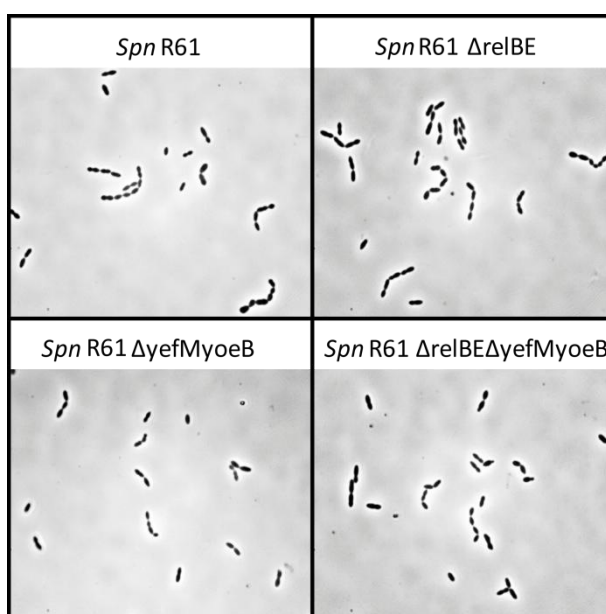


Figura 52. Visualización de los cultivos de *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ por microscopía de contraste de fases. Las estirpes se crecieron en medio AGCH a 37°C.

Morfología de las colonias de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes en placas de agar-sangre

Dado que se ha relacionado a los sistemas TA con variación fenotípica en la morfología de las colonias, se decidió analizar la posible variación en la morfología de las colonias en las estirpes mutantes. Para ello, crecimos *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ en AGCH completo y se sembraron en placas de agar-sangre. En las placas de agar-sangre *S. pneumoniae* crece formando colonias redondas, mucosas y no pigmentadas, de 1 a 3 mm de diámetro, las cuales al cabo de 48 horas presentan un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva. En estos medios con sangre las colonias producen una α -hemólisis, es decir digestión parcial de la hemoglobina, y la colonia se rodea de un halo verdoso. Se analizó la morfología de las colonias a diferentes tiempos de incubación a 37°C y no se observaron diferencias entre la estirpe silvestre y los mutantes después de 48 h o cuando se prolongaba la incubación hasta 6 días (Figura 53).

Por lo tanto, las estirpes mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ presentaron un crecimiento semejante a la estirpe silvestre, tanto en medio líquido como sólido, y no se detectaron diferencias en su morfología ni a nivel microscópico (células) ni a nivel macroscópico (colonias).

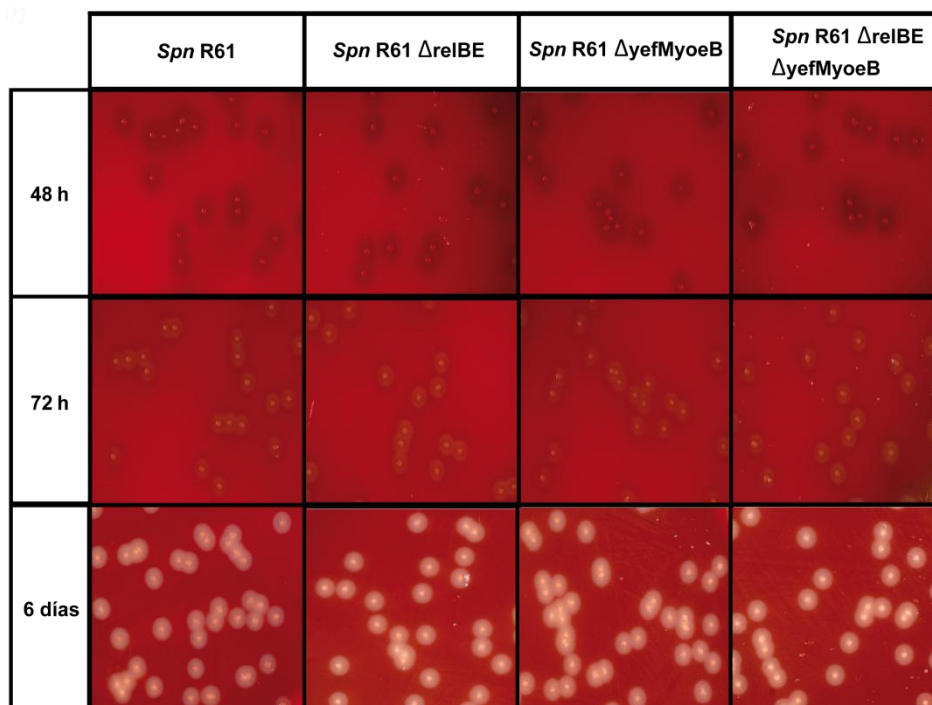


Figura 53. Imágenes de las colonias crecidas en placas de agar-sangre a 37°C de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$.

Crecimiento de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes en condiciones de estrés: bajo pH o alta concentración de zinc

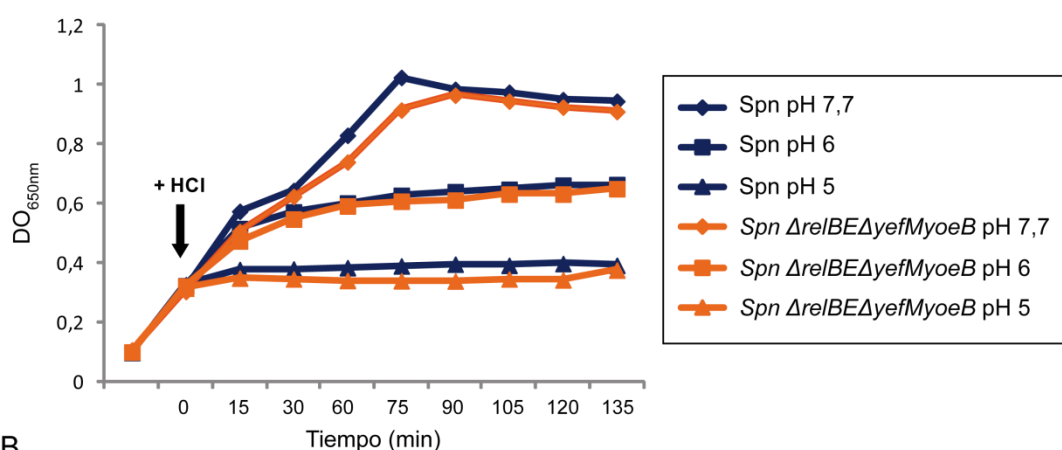
S. pneumoniae tiene que hacer frente a diferentes condiciones de acidificación tanto en las diferentes etapas de crecimiento *in vitro* (Martin-Galiano, *et al.*, 2005) como en diversos tejidos durante la infección (Light, *et al.*, 1980; Andersen, *et al.*, 1989). *S. pneumoniae* posee un mecanismo de tolerancia a condiciones ácidas (ATR, del inglés “Acid Tolerance Response”) y se ha descrito que a pH 5,6 sólo un pequeño porcentaje de la población es capaz de sobrevivir (Martin-Galiano, *et al.*, 2005). Para analizar el comportamiento en el crecimiento de las estirpes R61 silvestre y el doble mutante Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn frente a condiciones de pH ácido, las células se crecieron a 37°C en medio AGCH completo hasta alcanzar una DO₆₅₀ = 0,3 y se añadió ácido clorhídrico hasta disminuir el pH del medio hasta pH 6 y pH 5. La acidificación del medio provocó una parada en el crecimiento tanto de la estirpe silvestre como de la mutante, más acusada cuando el pH del medio descendió a pH 5 que cuando descendió a pH 6 (Figura 54A). Sin embargo, el comportamiento del doble mutante fue indistinguible del mostrado por la estirpe silvestre.

Además del pH, existen otros factores que pueden interferir en el crecimiento bacteriano, así, los iones de metales de transición (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) pueden ser esenciales o tóxicos para los microorganismos. El manganeso, que se encuentra en forma de catión divalente (Mn^{2+}), es un elemento esencial para *S. pneumoniae*, ya que se requiere en procesos relacionados con la regulación de genes asociados a virulencia, proliferación y respuesta al estrés oxidativo (Ogunniyi, *et al.*, 2010; Tseng, *et al.*, 2002). El zinc (Zn^{2+}), al igual que el manganeso, es un elemento esencial para las bacterias, pero a elevadas concentraciones puede resultar sumamente tóxico. El zinc se encuentra en diferentes concentraciones en humanos dependiendo del tejido, nasofaringe (5 μ M), pulmones (300 μ M) suero (15 μ M) (Versiek, 1985; Forte, *et al.*, 2004; Blazewicz, *et al.*, 2010; Jacobsen, *et al.*, 2011). Además, las células dañadas, como resultado de una infección bacteriana, liberan el zinc que formaba parte de las proteínas celulares, y esta elevación en los niveles de zinc extracelular podría servir para frenar el crecimiento bacteriano. El Zn^{2+} en altas concentraciones compite con el Mn^{2+} por la proteína transportadora PsaA, necesaria para el transporte intracelular de Mn^{2+} y de esta forma interferiría con procesos esenciales para la viabilidad celular (McDevitt, *et al.*, 2011).

Dado que no habíamos observado diferencias entre la estirpe silvestre y los mutantes en los ensayos anteriores, decidimos analizar el efecto de una elevada concentración de zinc en el crecimiento de la estirpe silvestre y el doble mutante. Las células se crecieron a 37°C en medio AGCH y en medio AGCH suplementado con 0,2 mM; 0,5 mM o 1 mM de $ZnSO_4$. Como se observa en la figura 54B, el aumento de la concentración de zinc en los medios de cultivo

provocó una disminución en la proliferación celular con un perfil similar, tanto en la cepa silvestre, como en la mutante.

A



B

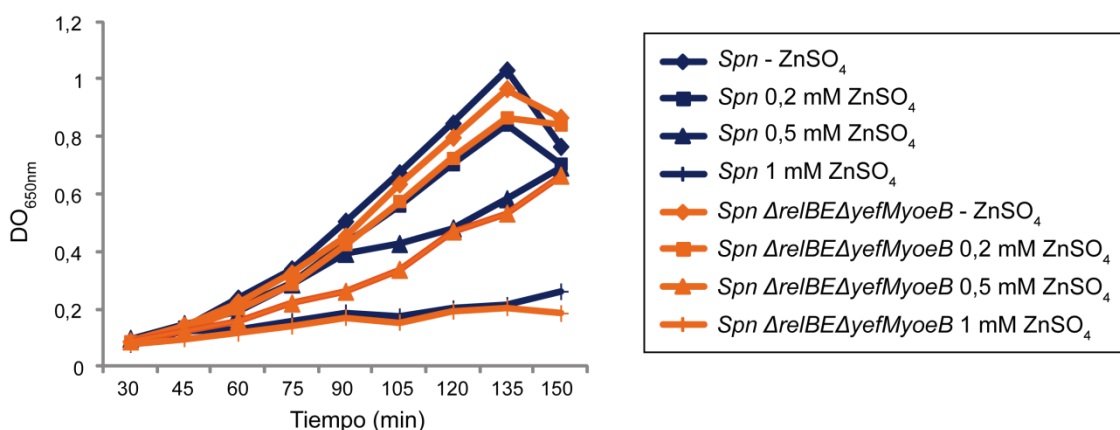


Figura 54. Curvas de crecimiento de *S. pneumoniae* R61 silvestre y el doble mutante en condiciones de estrés ácido y frente a diferentes concentraciones de zinc. (A) Curvas de crecimiento de *S. pneumoniae* R61 silvestre (azul) y el doble mutante $\Delta relBE\Delta yefMyoeB$ (naranja) en condiciones de estrés ácido. Los cultivos se crecieron a 37°C en medio AGCH hasta alcanzar una DO_{650} de 0,3 y se añadió ácido clorhídrico a 0,5 N (flecha negra) hasta disminuir el pH del medio hasta pH 6 (cuadrados) y pH 5 (triángulos). El crecimiento se determinó mediante la medida de densidad óptica DO_{650} . (B) Crecimiento de *S. pneumoniae* R61 silvestre (azul) y el doble mutante (naranja) frente a diferentes concentraciones de zinc. Los cultivos se crecieron a 37°C en medio AGCH (rombos) y en medio AGCH suplementado con 0,2 mM (cuadrados); 0,5 mM (triángulos) o 1 mM (línea vertical) de $ZnSO_4$. El crecimiento se determinó mediante la medida de la DO_{650} .

3.2.2. Transformabilidad de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes

Para calcular la frecuencia de transformación de *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$, se transformaron los cultivos competentes de cada una de las estirpes con DNA cromosómico aislado de la estirpe RF46SKNE, que contiene, entre otros, un marcador de resistencia a estreptomicina, de fácil selección en *S. pneumoniae*. Una vez seleccionados los transformantes se calculó la frecuencia de transformación (v_T) con la siguiente fórmula:

$$v_T = (N^{\circ} \text{ transformantes} / N^{\circ} \text{ viables}) \times 100$$

Los resultados (Tabla 15) mostraron que la delección de los sistemas *RelBE2Spn* o *YefMYoeBSpn* condujo a una reducción pequeña, pero significativa, de la frecuencia de transformación. Además esta reducción se incrementó en el caso del doble mutante, lo que sugiere que ambos sistemas participarían en los niveles de competencia y/o transformabilidad de *S. pneumoniae*.

Tabla 15. Frecuencias de transformación (%) de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$.

Estirpe	Frecuencia de transformación (%)	%
<i>Spn</i> R61	0,248 ± 0,005	100
<i>Spn</i> R61 $\Delta relBE2Spn$	0,205 ± 0,002	83
<i>Spn</i> R61 $\Delta yefMyoeBSpn$	0,198 ± 0,003	80
<i>Spn</i> R61 $\Delta relBE\Delta yefMyoeB$	0,143 ± 0,004	57

3.2.3. Capacidad de formación de *biofilms* de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes

Se analizó la capacidad de formar *biofilms in vitro* de la estirpe *S. pneumoniae* R61 silvestre y los mutantes Δ relBE2Spn, Δ yefMyoeBSpn y Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn. La capacidad para formar *biofilm* se cuantificó mediante tinción con cristal violeta. Los *biofilms* generados se visualizaron utilizando microscopía láser confocal espectral (CLSM).

Se utilizó la estirpe *S. pneumoniae* R61, estirpe no capsulada derivada de la estirpe D39, ya que hay múltiples evidencias de que mutantes pneumocócicos no capsulados muestran una mayor capacidad de adhesión y por tanto son más propensos a formar *biofilms in vitro* que las estirpes capsuladas (Waite, *et al.*, 2001; Waite, *et al.*, 2003; Moscoso, *et al.*, 2006; Allegrucci y Sauer, 2007; McEllistrem, *et al.*, 2007; Muñoz-Elías, *et al.*, 2008). Para cuantificar la formación de *biofilm*, las estirpes se crecieron en medio C a 34°C o 37°C durante 6h en placas de poliestireno de 96 pocillos. Finalizada la incubación, se midió la absorbancia a 595 nm para determinar el crecimiento bacteriano. Se tiñeron las preparaciones con cristal violeta para valorar el *biofilm* formado, se eliminaron las bacterias no adheridas y se cuantificó el *biofilm*, previamente solubilizado con etanol, midiendo la absorbancia a 595 nm.

Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento de todas las estirpes fue similar a 37°C (Figura 55A y B, barras gris oscuro). Sin embargo, se observaron pequeñas diferencias en la proporción de formación de *biofilm* entre la estirpe silvestre y los mutantes (Figura 55A y B, barras negras), observándose una pequeña disminución en la formación de *biofilm* en los mutantes Δ relBE2Spn y Δ yefMyoeBSpn, y una mayor disminución en el doble mutante. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas según la prueba t-Student.

También se evaluó la capacidad de formación de *biofilm* de estas estirpes a 34°C, temperatura de la nasofaringe (Keck, *et al.*, 2000), principal vía de colonización de *S. pneumoniae*. En estas condiciones el crecimiento de todas las estirpes fue similar (Figura 55C y D, barras gris oscuro). Comparando la formación de *biofilm* de la estirpe mutante Δ relBE2Spn con la silvestre, se obtiene una pequeña diferencia, aunque no era estadísticamente significativa. Pero sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la estirpe silvestre y los mutantes Δ yefMyoeBSpn y Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn, obteniéndose una disminución en la formación de *biofilm* prácticamente idéntica en ambos mutantes (Figura 55C). Además se calculó la formación relativa de *biofilm* con respecto a la estirpe silvestre, a la que se le dio un valor de formación de *biofilm* del 100%. De esta manera, la formación de *biofilm* del mutante Δ relBE2Spn fue alrededor del 90% y de los mutantes Δ yefMyoeBSpn y Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn fue del 80% (Figura 55D).

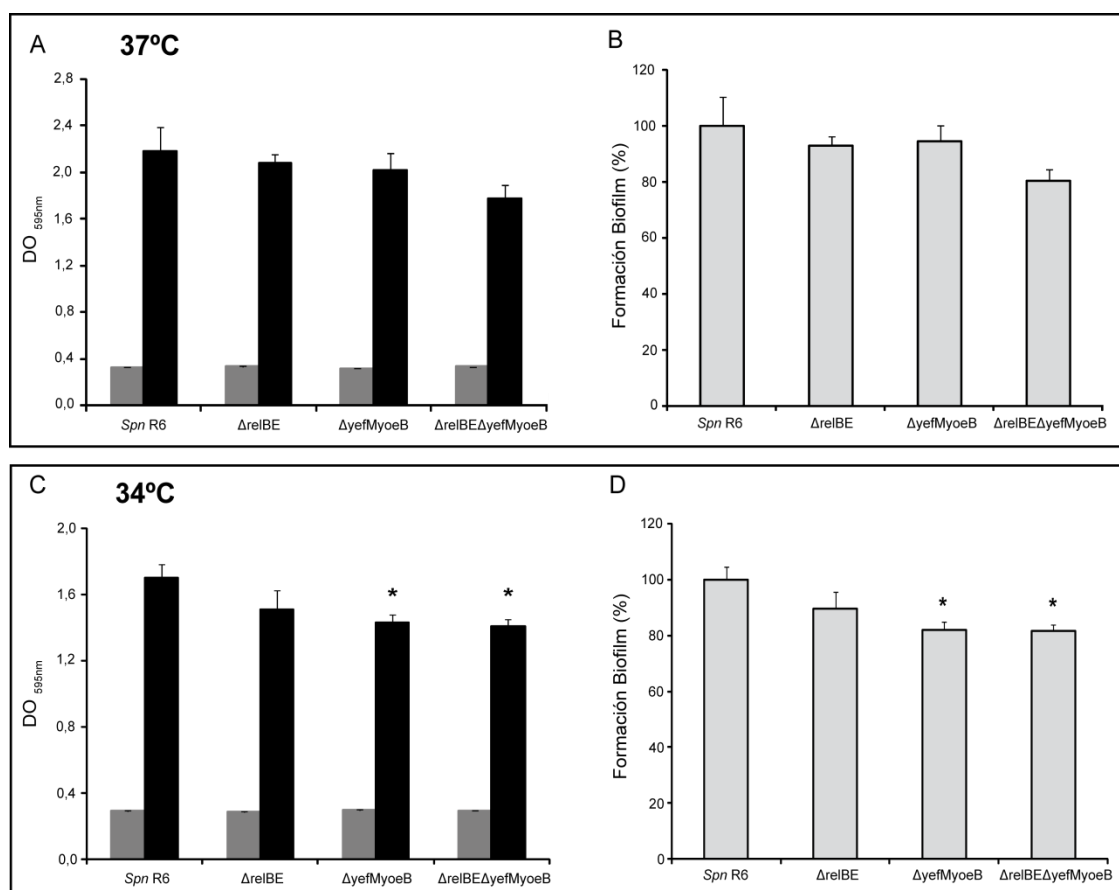


Figura 55. Formación de *biofilms* de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y mutantes $\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMyoeBSpn$ y $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$. (A, C) Medida de absorbancia (DO₅₉₅) para determinar el crecimiento bacteriano (barras grises) y la formación de *biofilm* (barras negras) (A) a 37°C durante 6h en medio C y (C) a 34°C durante 6h en medio C. (B, D) Formación relativa de *biofilm* (%) en medio C, calculada como el cociente entre la medida de absorbancia de *biofilm* y la absorbancia del cultivo, adjudicando un valor de 100% al valor obtenido en la estirpe silvestre (B) a 37°C durante 6h y (D) a 34°C durante 6h en medio C. Los valores son el resultado de la media de los valores de siete experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos marcan los casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras analizar los datos mediante la prueba t-Student.

Para la observación de los *biofilms* por CLSM, las estirpes R61 silvestre y el doble mutante se crecieron en medio C a 34°C durante 5h en placas con fondo de cristal *Glass-bottomed WillCo-dish*. Finalizada la incubación el *biofilm* formado se tiñó con el kit de viabilidad celular *LIVE/DEAD (BacLight bacterial viability kit)* para observar en color rojo las células bacterianas con la membrana dañada y que tienen su viabilidad comprometida, y en color verde las células bacterianas con la membrana intacta. Comparando los *biofilms* formados por ambas estirpes se observaron claras diferencias en cuanto a la apariencia y grosor. La estirpe silvestre mostró una mayor densidad celular y un grosor de aproximadamente 11 μm (Figura 56A). Sin embargo, en el *biofilm* del doble mutante $\Delta relBE2Spn\Delta yefMyoeBSpn$ se observó menor densidad celular, y el *biofilm*

presentó un menor grosor ($\sim 7 \mu\text{m}$) (Figura 56B). Además, en el *biofilm* del doble mutante se observó mayor proporción de células no viables (células rojas), que en el *biofilm* generado por la estirpe silvestre.

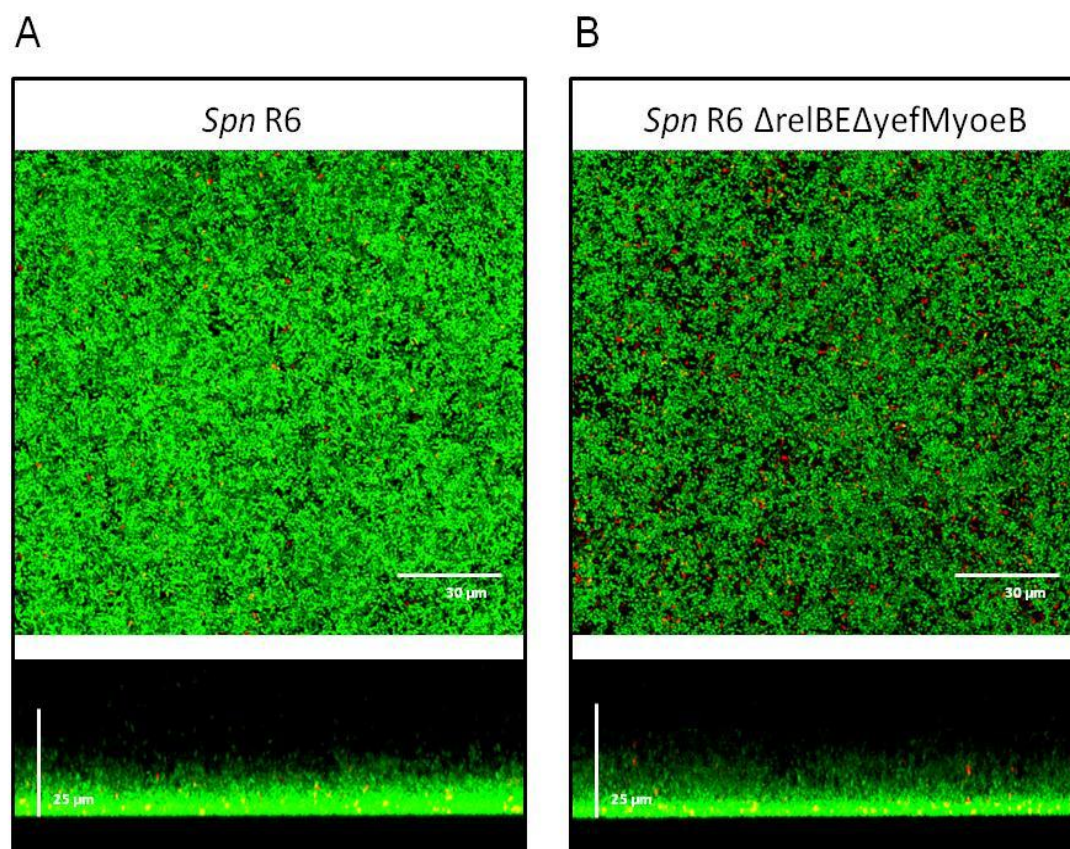


Figura 56. Imágenes de CLSM de la viabilidad de las estirpes R61 silvestre y doble mutante creciendo en *biofilm*. Las estirpes se incubaron a 34°C durante 5h en medio C. A continuación, las células se tiñeron con el kit *LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit*. En verde aparecen las células bacterianas vivas (con la membrana celular intacta) y en rojo la células con su viabilidad comprometida. Los paneles superiores muestran la reconstrucción horizontal en 3D tras la adquisición de 40 secciones en el plano x-y, y los paneles inferiores la reconstrucción vertical en 3D tras la adquisición de 68 secciones en el plano x-z.

3.2.4. Papel de los TAS RelBE2Spn y YefMYoeBSpn de *S. pneumoniae* en persistencia infectiva

Se estudió el papel de los TAS de pneumococos, en concreto RelBE2Spn y YefMYoeBSpn, en la persistencia infectiva, considerada ésta como el aumento de la capacidad que posee *S. pneumoniae* de infectar células eucariotas manteniendo su capacidad de supervivencia. Para desarrollar este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro*, utilizando células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (línea celular A549) y células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (línea celular Huvec). En las células infectadas se

analizó la capacidad de adhesión y la capacidad de invasión de las estirpes *S. pneumoniae* R61 silvestre y doble mutante Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn.

En primer lugar se valoró la capacidad de adhesión de la estirpes silvestre y doble mutante, portadoras del plásmido pASTP_{ung} (expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente verde GFP), en células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (A549). La infección se realizó utilizando cuatro multiplicidades de infección (MOI, del inglés "Multiplicity Of Infection"): MOI 50:1, 20:1, 10:1 y 5:1 (bacterias:células eucarióticas) en medio DMEM sin antibióticos, incubándose las placas durante 2 ó 4 horas a 37°C y en presencia de 5% de CO₂. Finalizada la infección, las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraban que el número de bacterias, alrededor y sobre las células humanas era mayor a medida que aumentaba la MOI y el tiempo de infección. En la figura 57A se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a una infección realizada con una MOI 50:1 y un tiempo de incubación de 2 h. En estas imágenes no se detectaron diferencias significativas en el número de bacterias adheridas a la superficie de las células humanas entre la estirpe silvestre y el doble mutante.

Para valorar de forma cuantitativa la capacidad de adhesión de las estirpes bacterianas utilizadas en el ensayo se utilizó citometría de flujo, utilizando la técnica FACS (del inglés "Fluorescence-Activated Cell Sorting"). Esta técnica permite obtener una medida del número de bacterias adheridas a la superficie de las células. Tras la infección de las células A549 con la estirpe silvestre y doble mutante, se realizaron lavados de las muestras para eliminar las bacterias no adheridas y las preparaciones se analizaron en un citómetro de flujo. En este ensayo se utilizaron como controles muestras que incluyen sólo la estirpe R61 silvestre (Figura 57B) o células A549 sin infectar (Figura 57C). Comparando los perfiles de las células humanas infectadas con cada una de las estirpes con el perfil de las células humanas sin infectar, no se observó ninguna señal de fluorescencia correspondiente a la población bacteriana, tanto de la estirpe silvestre como de la mutante. Por lo tanto, mediante esta técnica no se detectó adhesión de las células bacterianas, silvestre o doble mutante Δ relBE2Spn Δ yefMyoeBSpn, a la superficie de las células humanas.

Además, se analizó la capacidad de invasión de *S. pneumoniae* R61 silvestre y doble mutante, por un lado, mediante recuento de bacterias viables en las células humanas infectadas (determinación de unidades formadoras de colonias, cfu) y por otro, mediante la utilización de doble inmunofluorescencia. En el ensayo de invasión las infecciones se prolongaron durante 4h utilizando distintas MOI (50:1, 20:1, 10:1 y 5:1). Finalizado el tiempo de infección, se añadió a las preparaciones gentamicina, penicilina y estreptomycin (durante 2 h) para eliminar las bacterias extracelulares. Se lisaron las células infectadas y se sembraron diluciones seriadas de las muestras en placas de agar-sangre para

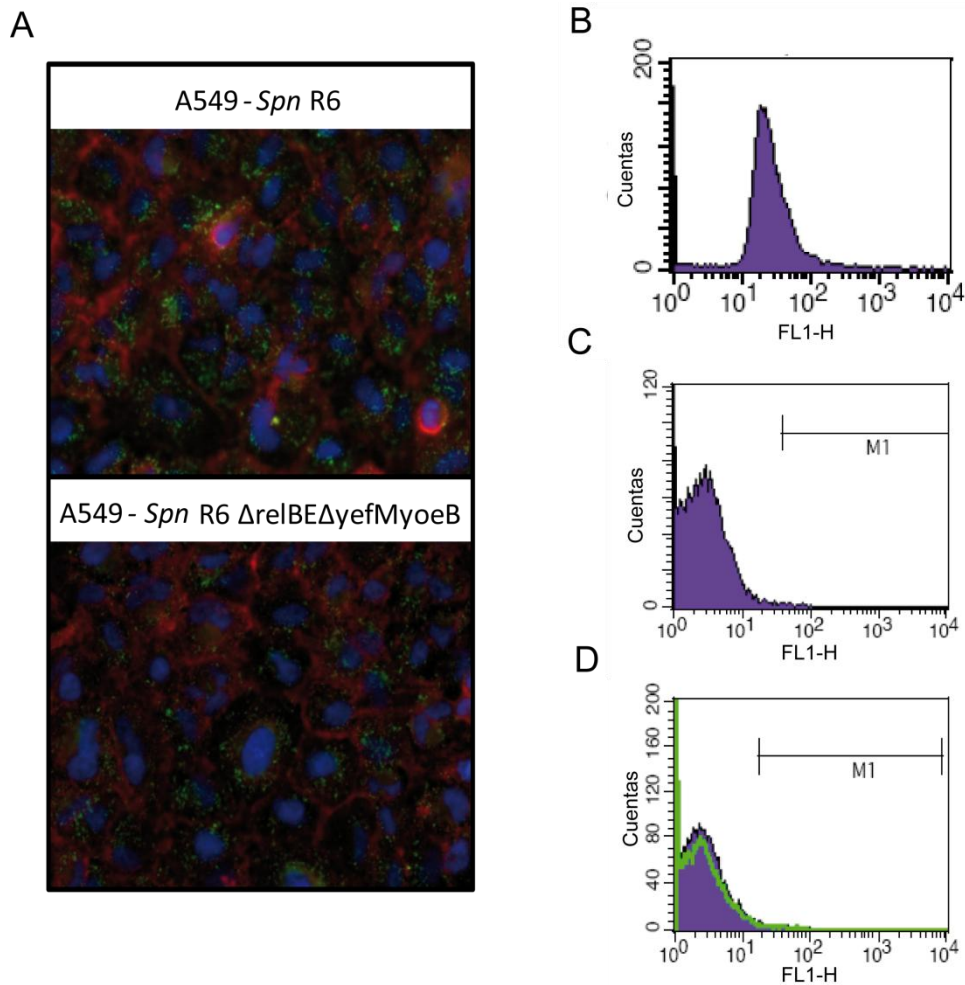


Figura 57. Infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (línea celular A549) con la estirpe silvestre y doble mutante de pneumococos. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia del resultado de la infección de células A549 con la estirpe silvestre (panel superior) y con el doble mutante (panel inferior) ambas portadoras del plásmido pASTP_{ung}. La infección se realizó a 37°C, 5% de CO₂, en medio DMEM durante 2h, utilizando una MOI de 50:1. Las bacterias se observan en color verde (GFP). En azul se observan los ácidos nucleicos (tinción con *fluoroshield*-DAPI) y en rojo la actina de las células (tinción con AlexaFluor568-Faloidina). (B-D) Análisis por citometría de flujo (análisis FACS) de la infección realizada en las mismas condiciones descritas en A. (B) Perfil de fluorescencia de *S. pneumoniae* R61 silvestre. (C) Perfil de fluorescencia de células A549 sin infectar. (D) Perfil de fluorescencia de células infectadas con la estirpe silvestre (perfil violeta) y con la estirpe doble mutante (perfil verde).

hacer el recuento de bacterias intracelulares. Los resultados de cuatro experimentos independientes y utilizando tres réplicas de cada MOI, no fueron reproducibles. Por ello, se analizaron las muestras mediante doble inmunofluorescencia, para visualizar por microscopía las bacterias extracelulares e intracelulares. Después de la infección en las condiciones anteriores, y tras la incubación durante 2h en presencia de los antibióticos, la inmunodetección de las bacterias extracelulares se realizó incubando las muestras con un anticuerpo

primario frente a la proteína de superficie A de *S. pneumoniae* preparado en conejo y utilizando como secundario un anticuerpo frente a inmunoglobulina G de conejo marcado con AlexaFluor488 (verde). Tras lisar las células humanas con tritón X-100, las bacterias intracelulares se detectaron con un anticuerpo primario frente a la proteína A de *S. pneumoniae* preparado en conejo y utilizando como secundario un anticuerpo frente a inmunoglobulina G de conejo marcado con Alexa568 (rojo). En la figura 58 se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia resultado de la doble inmunofluorescencia. En estas imágenes se observaron las bacterias extracelulares en color naranja (están teñidas de verde y rojo) pero en ninguna de las preparaciones, estirpe silvestre y mutante, se detectan bacterias intracelulares (color rojo).

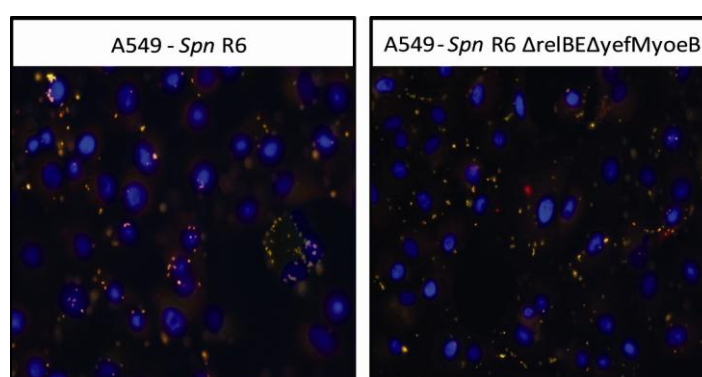


Figura 58. Infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (línea celular A549) con *S. pneumoniae* R61 silvestre y doble mutante. Imágenes de microscopía de fluorescencia del ensayo de infección utilizando una doble inmunofluorescencia. La infección se realizó a 37°C, 5% de CO₂, en medio DMEM durante 4h, utilizando una MOI de 50:1. A continuación, se añadieron los antibióticos gentamicina (100 µg/ml), penicilina (100 µg/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y se incubó durante 2h más. Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario específico para pneumococo preparado en conejo y a continuación se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 (verde) preparado en ratón que reconoce inmunoglobulinas de conejo y que permite localizar las bacterias extracelulares. Tras lisar las células humanas con tritón X-100, se detectaron las bacterias intracelulares utilizando un anticuerpo primario específico para pneumococo preparado en conejo y un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo y conjugado con Alexa568 (rojo). De esta manera, las bacterias extracelulares se observarían en color naranja y las intracelulares se observarían en color rojo. Las muestras además fueron teñidas con *fluoroshield*-DAPI para observar en color azul los ácidos nucleicos.

Podemos concluir que no se observó adhesión ni invasión de las estirpes bacterianas utilizadas en la infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón (A549) en las condiciones ensayadas.

Además, se realizó la infección de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (Huvec) con la estirpe silvestre y la doble mutante. La infección se realizó en medio BME sin antibióticos a 37°C y en presencia de 5% de CO₂,

durante 2h utilizando distintas MOI 50:1, 20:1 y 10:1. Las preparaciones se visualizaron empleando microscopía de fluorescencia pero no se observaron diferencias en la capacidad de adhesión a células endoteliales entre la estirpe silvestre y el doble mutante (Figura 59).

La capacidad de adhesión a células endoteliales (Huvec) también se evaluó mediante FACS. Comparando los perfiles de las células infectadas con la estirpe silvestre o con el doble mutante con los perfiles de los controles de células sin infectar y de bacterias, se observó una pequeña proporción de bacterias en las muestras infectadas (Figura 59). Sin embargo esta presencia de bacterias es muy reducida teniendo en cuenta la MOI y el tiempo de infección empleados, por lo que no se puede afirmar que las células de pneumococos se adhiriesen a las células endoteliales en las condiciones ensayadas.

Por tanto, concluimos que no hemos sido capaces de observar diferencias en la adhesión ni en la invasión de la estirpe silvestre y de la estirpe doble mutante durante la infección de células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón, así como tampoco la adhesión a células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

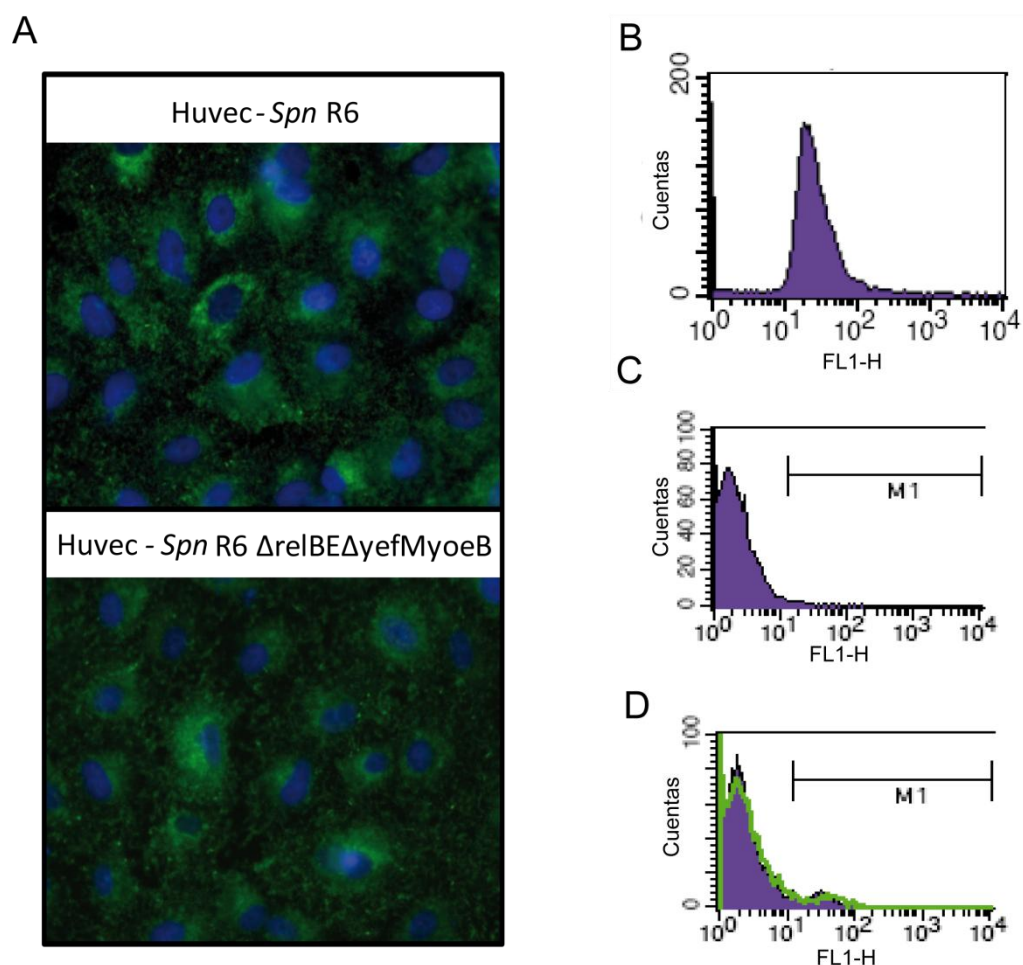


Figura 59. Infección de células endoteliales humanas de la vena umbilical (línea celular Huvec) con pneumococos silvestre y doble mutante. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia del resultado de la infección de células Huvec con la estirpe silvestre (panel superior) y con el doble mutante (panel inferior) portadoras del plásmido pAST P_{ung} . La infección se realizó a 37°C, 5% CO₂, 2 h, en medio BME, usando una MOI de 50:1. Las bacterias se observan en color verde (GFP). Las muestras se tiñeron con *fluoroshield*-DAPI para observar en color azul los ácidos nucleicos. (B-D) Análisis por citometría de flujo (análisis FACS) de la infección realizada en las mismas condiciones descritas en A. (B) Perfil de fluorescencia de *S. pneumoniae* R61 silvestre. (C) Perfil de fluorescencia de células Huvec sin infectar. (D) Perfil de fluorescencia de células infectadas con la estirpe silvestre (perfil violeta) y con la estirpe doble mutante (perfil verde).

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO RelBE2*Spn* Y DE LA ANTITOXINA RelB2*Spn*

El sistema *relBE2Spn* es el primer sistema TA cromosómico, localizado en bacterias G+, que ha sido caracterizado como tal en su propio huésped, *S. pneumoniae* (Nieto, *et al.*, 2006). Este sistema presenta características similares a las descritas para *relBE* de *E. coli* (Gerdes, *et al.*, 2005). La sobreproducción de la toxina RelE2*Spn* inhibió el crecimiento celular, mientras que la coexpresión de la antitoxina RelB2*Spn* neutralizó el efecto citotóxico de la toxina pneumocócica (Nieto, *et al.*, 2006).

La antitoxina RelB2*Spn* y el complejo RelBE2*Spn* se purificaron a partir de células de *E. coli* y la identidad de estas proteínas se confirmó mediante ensayos de *western blot* y secuenciación del extremo N-terminal. La interacción entre la antitoxina RelB2*Spn* y la toxina RelE2*Spn*, confirmada *in vivo* utilizando la técnica de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) (Nieto, *et al.*, 2006), se ha podido también detectar *in vitro* ya que ambas proteínas co-eluyeron de una columna de afinidad por níquel cuando la toxina porta una cola de polihistidinas en su extremo C-terminal.

La secuenciación del extremo N-terminal y los ensayos de espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI Q-TOF realizados con las proteínas del complejo RelB2*Spn*-RelE2*Spn*, indicaron que, al menos en *E. coli*, tanto la antitoxina como la toxina presentaron dos codones de iniciación. Así, para la antitoxina se identificaron dos polipéptidos, uno que incluye la secuencia completa y otro en el que se ha perdido la metionina inicial, procesamiento común en muchas proteínas procarióticas. En el caso de la toxina se han detectado dos variantes, una que contiene la secuencia completa y otra en la que se han perdido los tres primeros residuos aminoacídicos, siendo esta la forma mayoritaria en las preparaciones. La síntesis de dos moléculas diferentes de toxina que difieren en la región N-terminal puede responder a un procesamiento post-traducciona por proteasas celulares o a la existencia de dos posibles secuencias de Shine-Dalgarno alternativas para el gen *relE2Spn* en *E. coli* (Figura 60). El reconocimiento de una u otra podría explicar las dos secuencias N-terminal propuestas para la toxina RelE2*Spn* dependiendo de la estirpe. Así, RelE2*Spn* presentaría 87 residuos en la estirpe D39 y 84 en la estirpe TIGR4 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomepri>).

La comparación de la predicción de estructura secundaria por métodos bioinformáticos entre distintas antitoxinas, evidenció similitudes entre la antitoxina RelB2*Spn* y las antitoxinas RelB de *E. coli* (RelB_{Ec}), CcdA y ParD y, sin embargo, difirió de las correspondientes antitoxinas de RelB de *P. horikoshii* (RelB_{Ph}) y RelB de *M. jannaschii* (RelB_{Mj}) (Figura 61A).



Figura 60. Secuencias de Shine-Dalgarno alternativas para el gen *relE2Spn* en *E. coli*. En azul se somborean las dos secuencias de Shine-Dalgarno alternativas (SD 1 y SD 2), en naranja se resaltan los dos posibles codones de iniciación de *relE2Spn* (inicio 1 e inicio 2) y en morado el codón de terminación de *relB2Spn*.

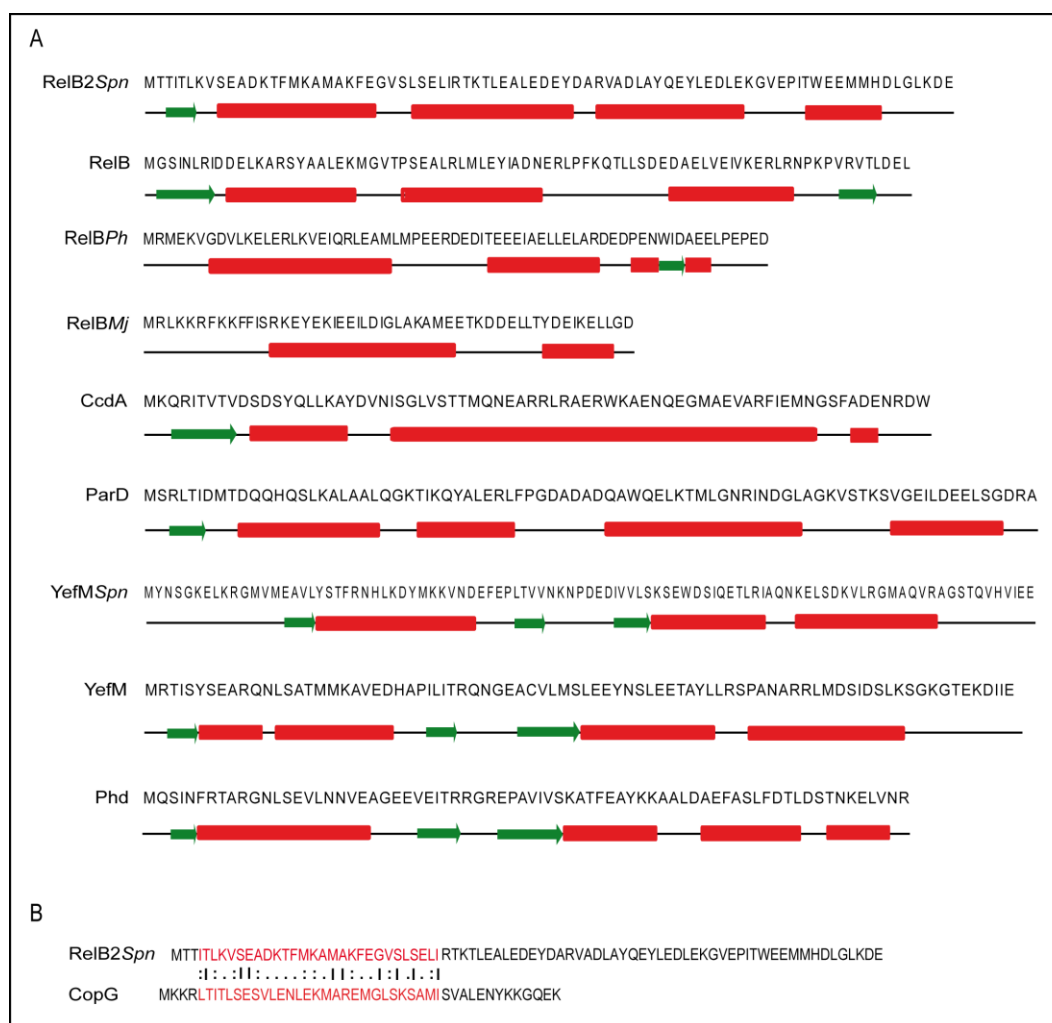


Figura 61. (A) Predicción de estructuras secundarias derivadas de la secuencia de diferentes antitoxinas: RelB2Spn, *S. pneumoniae*; RelB, *E. coli*; RelBPh, *P. horikoshii*; RelBMj, *M. jannaschii*; CcdA, *E. coli*; ParD, *E. coli*; YefMSpn, *S. pneumoniae*; YefM, *E. coli* y Phd, *E. coli*. Para asignar las estructuras a la secuencia de aminoácidos se utilizó el programa Porter. Las hélices α se representan con rectángulos rojos y las láminas β con flechas verdes. (B) Alineamiento de las secuencias de la antitoxina RelB2Spn y del represor transcripcional CopG (del Solar, *et al.*, 2002). La región de homología localizada en la región N-terminal (que contiene el dominio RHH) se muestra en rojo. El alineamiento se realizó utilizando la página web http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/.

Se realizó una primera aproximación a la caracterización estructural de la antitoxina y del complejo TA utilizando técnicas de DC. Los ensayos de DC permitieron analizar el contenido en estructura secundaria de estas proteínas. Los espectros de DC obtenidos con la antitoxina RelB2*Spn* tanto a 0°C como a 30°C, indicaron que, en solución, esta proteína presenta un contenido relativamente alto en estructura secundaria, representado por una elevada proporción de hélices α (32-36%) y menor proporción de láminas β (14-21%). Además, las estructuras no regulares o estructuras desordenadas representan un porcentaje importante en su conformación (47-49%) (Tabla 12). Estos resultados demuestran por un lado, que la antitoxina está parcialmente plegada al contrario que otras antitoxinas de la familia RelBE, como por ejemplo YefM de *E. coli* la cual, según algunos trabajos, se encontraría totalmente desplegada (Cherny y Gazit, 2004); por otro lado, nuestros resultados coinciden con los datos obtenidos previamente para la antitoxina RelB_{Ec} (Cherny, *et al.*, 2007). Además se observó que RelB_{Ec} sigue un patrón común en los espectros de DC con CcdA y ParD (Oberer, *et al.*, 1999; Dao-Thi, *et al.*, 2000).

Los datos de los ensayos de DC realizados con el complejo, indican que RelBE2*Spn* en solución presenta un alto contenido en estructura secundaria. La proporción en hélices α aumentó hasta aproximadamente el 40%, cuando la antitoxina RelB2*Spn* está acomplejada con la toxina RelE2*Spn*, mientras que el resto de elementos de estructura secundaria no varían con respecto a la antitoxina libre (Tabla 13).

La comparación de la estabilidad térmica de la antitoxina RelB2*Spn* y el complejo RelBE2*Spn* demostró que la antitoxina es menos susceptible a la agregación por elevada temperatura que el complejo, y además la antitoxina mostró una renaturalización parcial cuando se revirtió la temperatura, algo que no observamos en el caso del complejo RelBE2*Spn* (Figura 31). El extremo C-terminal donde en otras antitoxinas (HigA, Phd y CcdA) se encuentran localizadas las regiones desordenadas (Madl, *et al.*, 2006; Arbing, *et al.*, 2010; Garcia-Pino, *et al.*, 2010), en RelB2*Spn* presentó un alto contenido en aminoácidos cargados e hidrofílicos. Este hecho haría que la proteína fuese soluble a alta temperatura y que, por tanto, la desnaturalización térmica pudiese ser revertida, al menos parcialmente (Receveur-Bréchet, *et al.*, 2006). Por el contrario, el complejo RelBE2*Spn* podría mostrar una desnaturalización térmica irreversible debido a la exposición de regiones hidrofóbicas hacia el solvente, las cuales normalmente estarían enterradas en el complejo proteico.

Los ensayos de UA y de EMN han permitido determinar los estados de oligomerización del complejo RelBE2*Spn* y de la antitoxina RelB2*Spn*, así como la estequiometría de estos complejos. Los datos obtenidos en los ensayos de UA, utilizando el complejo RelBE2*Spn*, indicaron que la mayoría de las especies presentes (85%) coincidían con una forma heterohexamérica, aunque también se detectó una pequeña proporción de heterotrímeros (13%) y una fracción

mínima de heterododecámeros (1-2%) (Figura 34). Por otro lado, la técnica de EMN nos permitió determinar la estequiometría del complejo TA. La EMN había sido utilizada previamente para el estudio del sistema KisKid del plásmido R1 de *E. coli* (Monti, *et al.*, 2007). El uso de esta técnica nos ha permitido identificar el complejo RelBE2Spn como un heterohexámero (RelB2Spn)₂-(RelE2Spn)₂-(RelB2Spn)₂, aunque también se detectaron especies minoritarias tales como heterotrímeros (RelB2Spn)₂-(RelE2Spn)₁ y heterododecámeros formados por un dímero de heterohexámeros. La determinación de la composición de aminoácidos del complejo RelBE2Spn mostró una relación 2:1 de RelB2Spn:RelE2Spn. Por lo tanto, podemos concluir que los heterohexámeros de RelBE2Spn observados en solución en las condiciones ensayadas, están compuestos por la asociación de dos heterotrímeros y son la especie mayoritaria en solución.

Los experimentos de UA y de EMN también permitieron identificar a la antitoxina RelBSpn como una proteína dimerica en solución. El análisis bioinformático (Figura 61A) sugirió que el extremo N-terminal de cada monómero de antitoxina al dimerizar con otro, generaría un motivo de unión a DNA tipo RHH. RelB2Spn presenta un 32% de identidad y un 64% de similitud con la región N-terminal del represor transcripcional CopG del plásmido pMV158 (Pabo y Sauer, 1992; Gomis-Rüth, *et al.*, 1998; del Solar, *et al.*, 2002) (Figura 61B). Además, RelB2Spn presentó un 37% y un 39% de identidad con motivos RHH del extremo N-terminal de proteínas de la familia de CopG de *Fusobacterium nucleatum* (Kapatal, *et al.*, 2002) y de *Eubacterium yurii* (Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center, Houston, TX, www.hgsc.bcm.tmc.edu), respectivamente. El motivo de unión a DNA RHH en las antitoxinas se ha identificado en el extremo N-terminal tanto en RelB_{Ec} (Li, *et al.*, 2008; Overgaard, *et al.*, 2009; Bøggild, *et al.*, 2012) como en YefM de *E. coli* y de *M. tuberculosis* (Kamada y Hanaoka, 2005; Kumar, *et al.*, 2008). Sin embargo, este motivo está ausente en la estructura tridimensional de la antitoxina RelB_{Ph} (Takagi, *et al.*, 2005) y de RelB_{Mj} (Francuski y Saenger, 2009).

La resolución de la estructura cristalina del complejo RelBE2Spn ha permitido confirmar los datos previos de estructura cuaternaria derivados de los ensayos de UA y EMN. RelBE2Spn es el primer complejo del sistema RelBE de bacterias G+ del que se ha resuelto su estructura tridimensional. En la celda del cristal se han identificado dos tipos de complejos uno heterotetramérico y otro heterohexamérico (Figura 62).

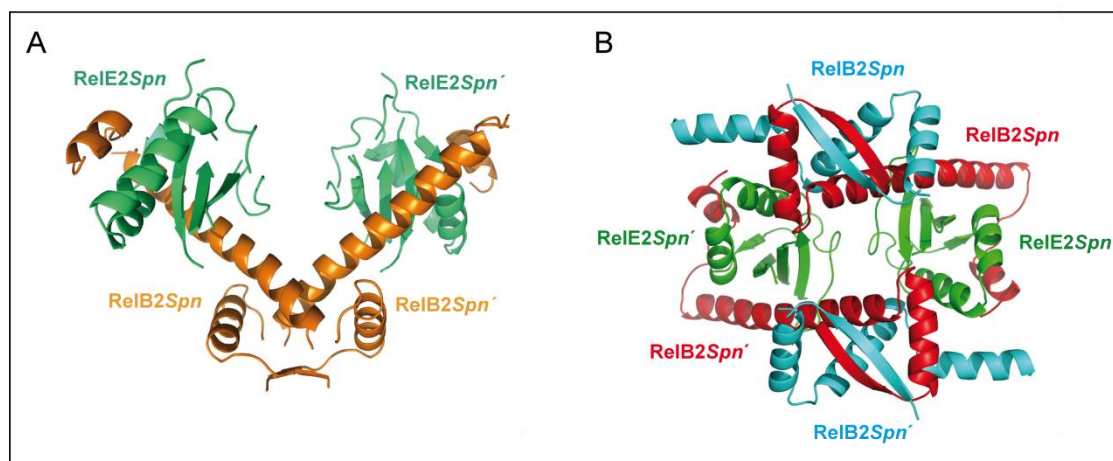


Figura 62. Estructura tridimensional del complejo RelBE2Spn. (A) Heterotetrámero RelB₂-RelE₂. La antitoxina RelB2Spn se representa en marrón y la toxina RelE2Spn en verde. (B) Heterohexámero (RelB₂-RelE)₂. Un monómero de antitoxina se representa en rojo y otro en azul, la toxina se representa en verde.

En el heterotetrámero RelE2Spn-(RelB2Spn)₂-RelE2Spn, las dos antitoxinas dimerizan formando un motivo RHH asociándose las toxinas a cada una de las moléculas de antitoxina. El plegamiento del complejo heterotetramérico presenta similitud con la estructura del complejo de similar estequiometría de RelBE_{Ec} (Bøggild, *et al.*, 2012) y difiere de las estructuras de RelBE_{Mj} (Francuski y Saenger, 2009) y de RelBE_{Ph} (Takagi, *et al.*, 2005) (Figura 11), no sólo porque en estas dos últimas no esté presente el motivo RHH sino también porque el plegamiento de las antitoxinas y los contactos entre antitoxina y toxina son diferentes. Sin embargo, la superposición de las estructuras conocidas de la familia de toxinas RelE, tales como RelE_{Ec}, RelE_{Mj} y RelE_{Ph} y YoeB de *E. coli*, así como el modelado de RelE2Spn utilizando la estructura de RelE_{Mj}, indicaron que estas proteínas presentan un plegamiento común y residuos altamente conservados (Francuski y Saenger, 2009; Nieto, *et al.*, 2010). Las toxinas de la familia RelE son endoribonucleasas que presentan similitud estructural con endoribonucleasas microbianas como la RNasa Sa de *Streptomyces aureofaciens*, RegB del bacteriófago T4 y las colicinas D y E5 (Francuski y Saenger, 2009; Li, *et al.*, 2009; Neubauer, *et al.*, 2009). La estructura de las toxinas RelE se caracteriza por la presencia de un armazón de láminas β flanqueado por hélices α (Figura 9). La estructura cristalina de RelE2Spn, aunque acomplejada a su antitoxina, es similar a la de las otras toxinas de la familia. Por tanto, las toxinas de este sistema, tanto en bacterias G+ y G- como en Archaea presentan un plegamiento común (Figura 63).

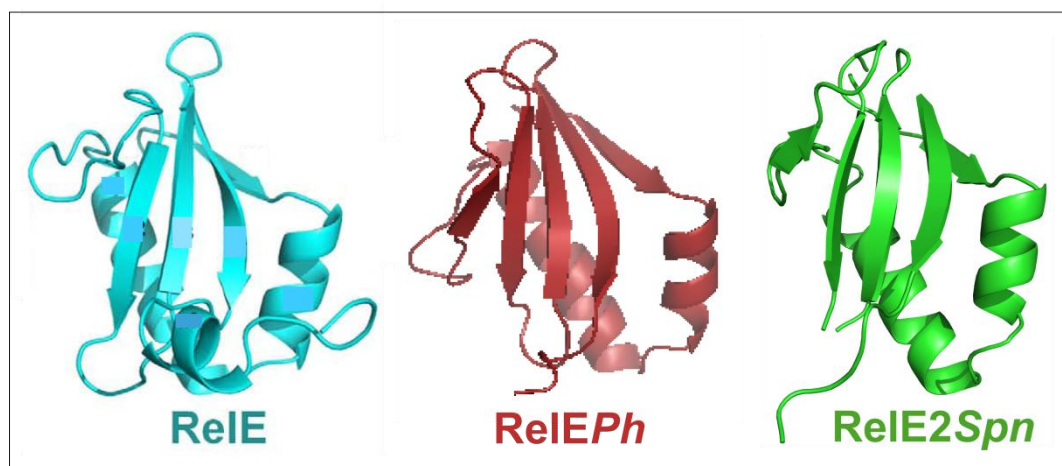


Figura 63. Similitud estructural de las toxinas RelE de *E. coli* (azul), de *P. horikoshii* (rojo) y de *S. pneumoniae* (verde). (Adaptado de Brown, *et al.*, 2009 y Takagi, *et al.*, 2005).

Como hemos indicado anteriormente, en la unidad cristalina del complejo TA de pneumococos, además de heterotetrámeros, se han identificado heterohexameros. El complejo RelBE2Spn es el primer sistema RelBE analizado con naturaleza heterohexamérica. Hasta el momento, todas las toxinas y antitoxinas de esta familia interaccionan generando complejos tetraméricos como los descritos para RelBE_{Mj} (Francuski y Saenger, 2009) y RelBE_{Ph} (Takagi, *et al.*, 2005) o como en el caso del complejo RelBE_{Ec} que, dependiendo de las aproximaciones experimentales utilizadas, se ha identificado en solución como un heterotetrámero (SEC-MALS, cromatografía de exclusión por tamaños de detección múltiple) (Li, *et al.*, 2008) o bien como un heterotrímero cuando se utilizan técnicas de resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés “*surface plasmon resonance*”) (Overgaard, *et al.*, 2008; Overgaard, *et al.*, 2009). El complejo heterohexamérico de RelBE2Spn está formado por la asociación de dos heterotrímeros (RelB2Spn)₂-RelE2Spn. Las toxinas RelE2Spn presentan un plegamiento similar al observado para las toxinas en la estructura heterotetramérica, y por lo tanto, común a las toxinas de la familia RelE. Sin embargo, cada una de las antitoxinas que forman parte de las subunidades heterotriméricas, presentan un plegamiento diferente. Así, uno de los protómeros de RelB2Spn se pliega configurando tres hélices α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), siendo la hélice $\alpha 2$ de mayor longitud que las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$, mientras el otro protómero se pliega en 3 hélices α de tamaño similar (Figuras 36 y 37). La presencia de dos conformaciones diferentes de antitoxinas se ha observado en otros sistemas TA, como PhdDoc del profago P1 de *E. coli* (García-Pino, *et al.*, 2010) y VapBC de *M. tuberculosis* (Min, *et al.*, 2012). En el primer caso se debe a la presencia en la toxina Doc de dos sitios diferentes de unión a Phd de mayor y menor afinidad (García-Pino, *et al.*, 2010), en el segundo caso, el complejo VapBC forma un heterooctámero donde las toxinas, con actividad ribonucleasa dependiente del ión Mg^{2+} , presentan dos conformaciones diferentes que le permiten unir o no

Mg^{2+} , y las antitoxinas presentan una conformación diferente según estén interaccionando con una toxina unida o no a Mg^{2+} .

En el complejo RelBE2*Spn*, el plegamiento diferencial de cada uno de los protómeros de antitoxina (en las subunidades heterotriméricas que configuran el heterohexámero) puede ser el resultado de la interacción de la toxina con cada una de las subunidades de antitoxina. La entrada de la toxina en el complejo estabilizaría el dímero de antitoxinas, aunque RelE2*Spn* podría establecer interacciones más débiles con sólo uno de los protómeros. Por tanto, el complejo RelBE2*Spn* podría estar en equilibrio entre una forma heterotetramérica, en la que se ha liberado una molécula de antitoxina en cada uno de los heterotrímeros, y otra conformación heterohexamérica. En condiciones de exceso de antitoxina, el equilibrio estaría desplazado hacia la formación del heterohexámero, mientras que cuando disminuye la cantidad de antitoxina se favorecería la formación del heterotetrámero.

En los ensayos de UA y EMN sólo se detectaron los heterohexaméros, si bien estos ensayos se realizaron en presencia de un exceso de antitoxina (Figura 35), es decir, en condiciones que favorecen la formación de heterohexaméros. Por el contrario, las condiciones en las que se realizaron los ensayos cristalográficos favorecerían la formación de las dos conformaciones. No obstante, experimentos preliminares de espectrometría de masas en tándem (MS/MS, realizados por E. Diago-Navarro) utilizando una fase gaseosa de argón para la disociación del complejo (Monti, *et al.*, 2007), indicaron que al menos una de las moléculas de antitoxina estaría más expuesta y parecería ser más susceptible de disociación del complejo heterohexamérico. Basados en estos datos, proponemos el modelo que se presenta en la Figura 64 para explicar las interacciones de RelB2*Spn* y RelE2*Spn*. Ambas proteínas podrían interaccionar formando heterohexaméros y heterotetrámeros. Entre el heterohexámero y el heterotetrámero existiría un equilibrio que, en solución y en condiciones de exceso de antitoxina RelB2*Spn*, estaría desplazado hacia la formación del heterohexámero. Sin embargo, las condiciones de cristalización permitirían la detección de las dos formas oligoméricas del complejo, el heterohexámero y el heterotetrámero.

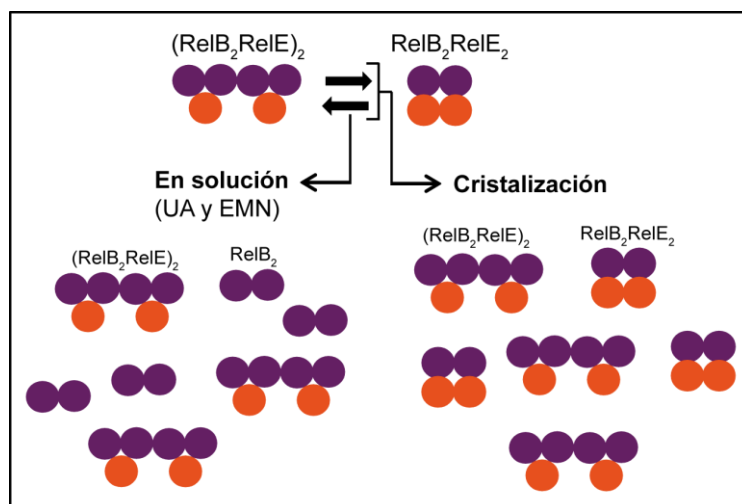


Figura 64. Modelo propuesto para las interacciones de RelB2Spn y RelE2Spn. En morado se representa la antitoxina RelB2Spn y en naranja la toxina RelE2Spn.

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL COMPLEJO RelBE2Spn Y DE LA ANTITOXINA RelB2Spn

2.1. Capacidades de unión a DNA y de autorepresión

En general, en los sistemas TA la expresión de los genes de la antitoxina y la toxina está autoregulada negativamente por la unión de la antitoxina o del complejo TA a una secuencia palindrómica localizada en la región promotora del operón TA. Por lo tanto, el complejo TA o la antitoxina funcionan como represores transcripcionales. La unión a la región promotora/operadora se produce a través del dominio de unión a DNA de la antitoxina. Por ello, la antitoxina es la que determina la especificidad de unión pero no la afinidad ya que el complejo TA se une con mayor afinidad y reprime la transcripción de una manera más eficiente que la antitoxina sola, indicando que la toxina actúa como co-represor (Magnuson y Yarmolinsky, 1998; Marianovsky, Aizenman *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2003; Gerdes, *et al.*, 2005; Monti, *et al.*, 2007; Li, *et al.*, 2008; Overgaard, *et al.*, 2008).

Los resultados de los ensayos de retardo en gel realizados con la antitoxina RelB2Spn y el complejo RelBE2Spn demostraron su capacidad de unión a un fragmento específico de DNA que incluye la región promotora del operón *relBE2Spn*, los sitios de inicio de la transcripción y la traducción y la secuencia de Shine-Dalgarno (Figura 38). Tanto RelB como el complejo RelBE se unieron a este fragmento, pero el complejo se unió con más afinidad al DNA que la proteína RelB sola. Nuestros resultados concuerdan con los datos descritos para otros sistemas TA como RelBE_{Ec} y YefMYoeB de *E. coli* (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008) y *S. pneumoniae* (Kedzierska, *et al.*, 2007; Chan, *et al.*, 2011). El análisis de los complejos generados en mezclas de DNA y diferentes cantidades de RelBE2Spn, sugirió que el complejo TA se unió

de forma no cooperativa a su diana, ya que solamente detectamos una banda retrasada como resultado de la interacción de RelBE2*Spn* con la secuencia operadora (Figura 38).

Por otro lado, los ensayos de regulación transcripcional indicaron que tanto la antitoxina RelB2*Spn* como el complejo RelBE2*Spn* actúan como elementos reguladores del operón *relBE2Spn* (Figura 48). Sin embargo, el complejo RelBE2*Spn* reprimió más eficientemente la transcripción que la antitoxina sola, lo que indica que la toxina RelE*Spn* actúa como co-represor del sistema. En estos ensayos de regulación transcripcional, observamos una reducción, moderada pero significativa, de los niveles de β -galactosidasa en presencia de la antitoxina o el complejo. Esta reducción no fue comparable con la obtenida para otros sistemas TA de *E. coli* como RelBE o YefM-YoeB (Gotfredsen y Gerdes, 1998; Kedzierska, *et al.*, 2007). Las diferencias observadas podrían deberse a que estos últimos ensayos se realizaron en el huésped propio, mientras que en nuestro caso hemos utilizado *E. coli* como huésped para la expresión de los genes de pneumococos. Resultados similares a los nuestros sobre represión transcripcional de genes de pneumococos en *E. coli*, realizados con genes de plásmidos (pMV158, pLS1) (del Solar, *et al.*, 1997; Lorenzo-Díaz, *et al.*, 2012) o cromosómicos (*yefMyoeBSpn*) (Chan, *et al.*, 2011) confirmarían tal represión génica modesta pero significativa.

Podemos concluir que los datos de represión transcripcional junto con los resultados de los ensayos de retardo en gel y *footprinting*, pusieron de manifiesto que la antitoxina RelB2*Spn* es el represor transcripcional del operón *relBE2Spn* y la toxina RelE2*Spn* actúa como un co-represor. Aunque no se han obtenido datos que demuestren que la toxina RelE2*Spn* no se une a DNA, el hecho de que la secuencia de reconocimiento para la antitoxina y el complejo TA sea similar, sugiere que es la antitoxina la que pilota la unión al DNA diana. Además, ensayos de espectrometría de masas en tándem, realizados con el complejo RelBE2*Spn* solo o unido a su DNA diana, indicaron que la toxina no parece participar de forma activa en la unión con el DNA, ya que su perfil de disociación, a diferencia de lo que ocurre con la antitoxina, no se modificó en presencia del ligando (resultados no mostrados). Por tanto, pensamos que la toxina RelE2*Spn* actuaría aumentando la estabilidad de la antitoxina, y para ello podría utilizar dos posibles estrategias que se han sugerido para la toxina RelE de *E. coli*: i) alterar la conformación de la antitoxina RelB creando una conformación óptima para la unión al DNA, o ii) crear una superficie en el complejo TA que sea complementaria con la superficie del DNA estabilizando el complejo en el sitio operador (Li, *et al.*, 2008).

2.2. Mecanismo de autorepresión y cooperatividad condicional: Caracterización del DNA diana

El mecanismo de autorepresión del complejo RelBE de *E. coli* ha sido analizado, de forma independiente, por los grupos de Gerdes y de Inouye. Ambos han identificado la secuencia operadora a la que se une el complejo RelBE. Esta secuencia operadora está constituida por dos repeticiones invertidas de 6 pb. Un dímero de la antitoxina RelB se uniría a cada una de estas repeticiones a través de un motivo RHH, proporcionando la unión de la toxina a la antitoxina una mayor estabilidad al complejo. Aunque ambos grupos coinciden en algunas de las características esenciales de la interacción, los modelos propuestos son diferentes. El modelo propuesto por Inouye (Li, *et al.*, 2008) asume que el complejo TA se uniría como un heterotetrámero a cada una de las secuencias invertidas de 6 pb que forman el elemento central de unión constituido por 12 pb, siendo cooperativa la unión de la proteína a cada uno de los sub-sitios que constituyen la secuencia operadora. Por el contrario, Gerdes propone que el complejo TA se uniría a cada una de las secuencias repetidas de 6 pb como un heterotrímero ocupando un complejo hexamérico la secuencia central de 12 pb (Overgaard, *et al.*, 2008). En nuestro caso, hemos identificado la región operadora a la que se une la antitoxina RelB2*Spn* y el complejo RelBE2*Spn* mediante ensayos de *footprinting*. Los patrones de protección frente a DNasa I y al ataque por radical hidroxilo fueron idénticos para la antitoxina y para el complejo TA. Los *footprintings* con DNasa I mostraron que el sitio operador comprende una región de 26 pb que incluye: i) la caja -10; ii) el sitio de inicio de la transcripción y iii) dos repeticiones invertidas de 3 pb y 6 pb denominadas respectivamente BL o BR (Figura 44). Las repeticiones invertidas cortas han sido identificadas en las regiones promotoras de otros sistemas TA (Kedzierska, *et al.*, 2007; Overgaard, *et al.*, 2008) y parecen jugar un papel en asegurar una eficiente represión transcripcional del operón TA (Kedzierska, *et al.*, 2007; Bailey y Hayes, 2009).

Una vez identificada la región operadora mínima de RelBE2*Spn* (26 pb), se utilizó un fragmento de DNA de 30pb, que incluía la secuencia diana, para obtener complejos DNA-proteína con la antitoxina o el complejo TA. Estos complejos se analizaron mediante ensayos de UA o de EMN, y se determinó su grado de oligomerización y su estequiometría. Los experimentos de UA mostraron que el complejo RelBE2*Spn* se une a su DNA operador como un heterohexámero. Por su parte, los ensayos de EMN indicaron, además, que el heterohexámero está constituido por la asociación de dos heterotrímeros, con dos moléculas de antitoxina y una de toxina cada uno de ellos. La antitoxina libre se une a su DNA operador formando un dímero, pero esta interacción es débil como se deriva de los resultados obtenidos en los ensayos de EMN de RelB2*Spn*-DNA, donde la mayoría de las especies detectadas fueron antitoxina o DNA libre y sólo una pequeña cantidad correspondió al complejo nucleoproteico. En estos ensayos se identificaron complejos (RelB2*Spn*)₂-DNA con diferentes

estequiometrias: 1:1, 2:1 y 3:1 (Figura 47). Las asociaciones que incluyen 1 o dos dímeros de antitoxina unidos a una molécula de DNA (1:1 y 1:2) serían compatibles con los resultados obtenidos por *footprinting*. Sin embargo, la estequiometría 3:1 (tres dímeros de antitoxina por molécula de DNA), no coincide con los datos experimentales previos y podrían deberse bien a uniones inespecíficas de la proteína al DNA o a la formación de agregados de antitoxina en la muestra. Cabe mencionar, que la representación realizada en la Figura 47 es meramente ilustrativa y no indica que los dímeros de antitoxina se unan a sitios diferentes en el DNA, sino que cabe la posibilidad de que los dímeros interaccionen unos con otros o se unan a sitios inespecíficos en el DNA diana.

El patrón de protección derivado de los experimentos de *footprinting* con radical hidroxilo permitió identificar las interacciones específicas del complejo RelBE2*Spn* con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA. El complejo RelBE2*Spn* establece la mayoría de sus contactos por la misma cara del DNA, excepto en una región correspondiente a tres nucleótidos (5'-TTC-3') que estarían localizados en otra cara del DNA. La región contactada sobre el DNA diana se extiende a lo largo de dos surcos mayores y dos surcos menores consecutivos (Figura 65).

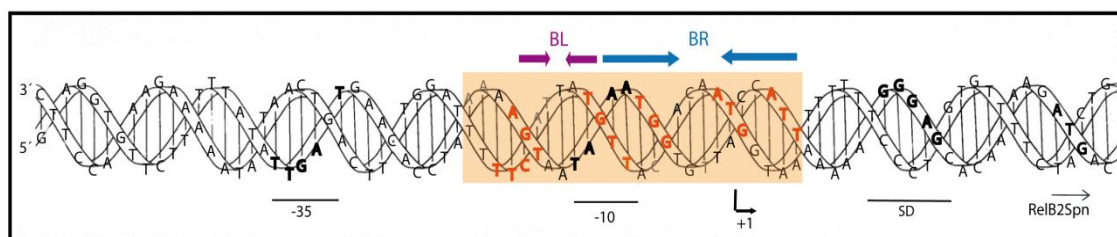


Figura 65. Representación sobre un modelo de DNA de doble hélice de las protecciones observadas frente a DNasa I y a radical hidroxilo en la región operadora. Los contactos de las proteínas se han representado sobre una doble hélice de B-DNA (10,5 pb/vuelta de hélice). El recuadro naranja indica la protección frente a DNasa I y las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por radical hidroxilo se muestran en color naranja. Se indica el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y el sitio de inicio de la traducción (ATG). Las flechas marcan las repeticiones invertidas localizadas en esta secuencia, BL y BR.

De acuerdo a este esquema de protección y considerando: 1) los datos de UA y EMN, realizados con los complejos RelBE2*Spn*-DNA, y 2) la naturaleza dimérica del motivo RHH de unión a DNA, el heterohexámero podría contactar con su región operadora a través de cada uno de los motivos RHH de los dímeros de antitoxina, encajándose cada par de cadenas β antiparalelas, que forman el motivo RHH, en cada uno de los surcos mayores que incluyen la secuencia de reconocimiento (Figura 66).

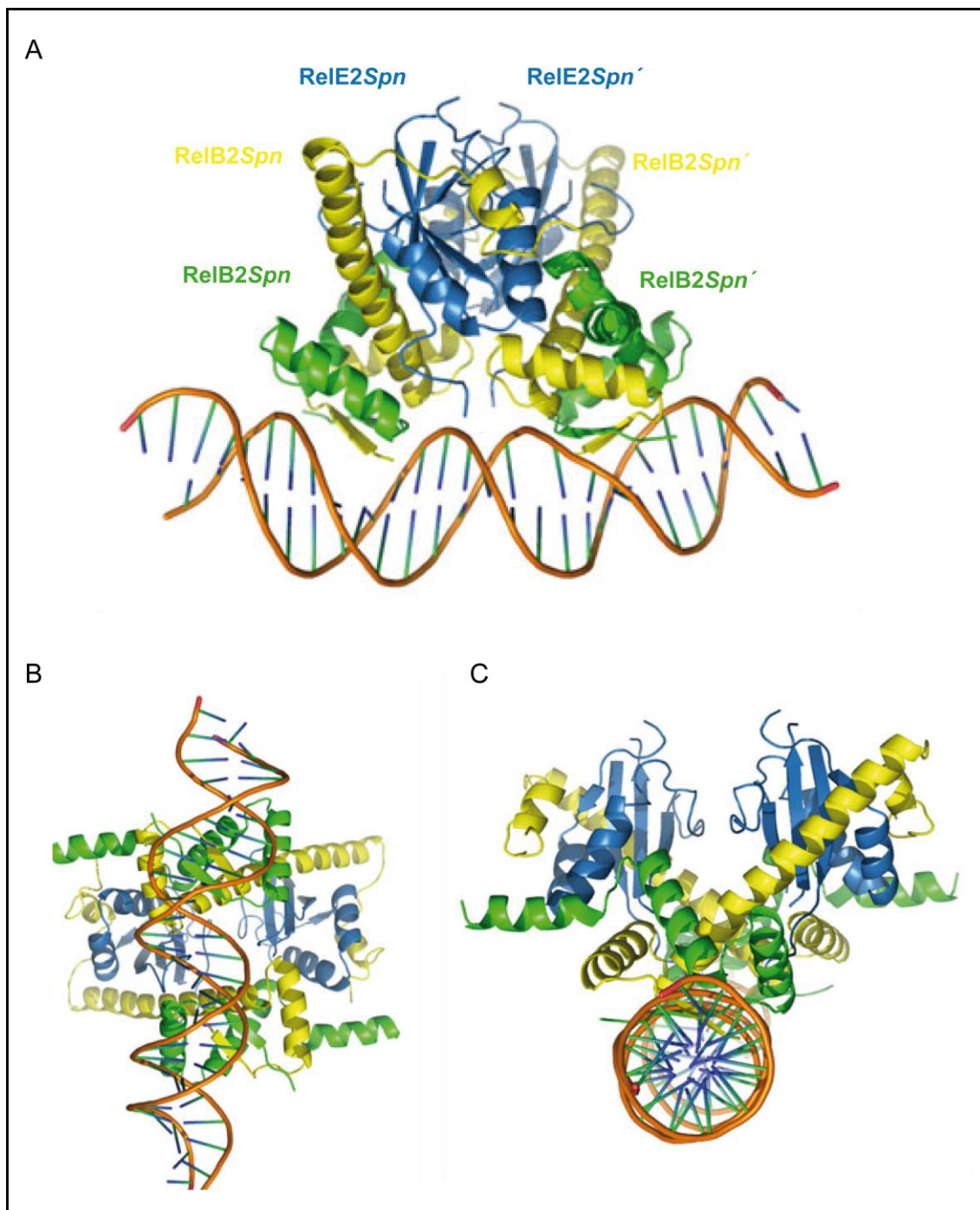


Figura 67. Modelo estructural del complejo RelBE2Spn-DNA, basado en la estructura cristalina del complejo RelBE2Spn heterohexamérico y del DNA operador del sistema FitAB de *N. gonorrhoeae* (Mattison, 2006). A, B, C. Representación desde distintos ángulos de rotación. Las antitoxinas RelB2Spn se representan en amarillo y verde y las toxinas RelE2Spn en azul. (Martínez Llinás, 2013).

Según este modelo, el heterohexámero del complejo RelBE2Spn sería la forma que contactaría con la secuencia operadora específica regulando de esta forma la transcripción del operón *relBE*. Sin embargo, como hemos indicado anteriormente, puede existir un equilibrio dinámico entre el heterohexámero y el

heterotetrámero. La presencia de ambas formas oligoméricas podría estar ligada, como se ha descrito en varios sistemas TA, a la existencia de mecanismos de cooperatividad condicional (ver apartado 3.3.2. de Introducción). El grupo de Gerdes ha elaborado un modelo detallado para intentar explicar el mecanismo de cooperatividad condicional en el sistema RelBE_{Ec} (Figura 68). Así, cuando las células de *E. coli* crecen exponencialmente, la toxina RelB se expresaría en exceso con respecto a la toxina formándose trímeros: (RelB)₂RelE y tetrámeros: (RelB)₂(RelE)₂; no obstante sólo el trímero (RelB)₂RelE sería capaz de unirse al DNA operador (Overgaard, *et al.*, 2009). La unión de un trímero al DNA operador promueve la unión de un segundo trímero a un sitio adyacente del DNA, formando un heterohexámero RelE-(RelB)₂-(RelB)₂-RelE que bloquearía la transcripción del operón *relBE* (Overgaard, *et al.*, 2009). Sin embargo, la degradación de la antitoxina, bajo circunstancias desfavorables de crecimiento (estrés nutricional, ayuno de aminoácidos), conduciría a un aumento en los niveles de toxina libre. Esta molécula de toxina RelE, liberada del complejo TA, interaccionaría con el extremo C-terminal libre de las antitoxinas que se encuentran formando parte del complejo heterohexamérico unido al DNA operador. La entrada de este monómero de toxina promovería la liberación de un tetrámero RelE-(RelB)₂-RelE. Una segunda molécula de toxina RelE se uniría al trímero (RelB)₂RelE que permanecía unido al DNA, facilitando su liberación mediada bien por cambios alostéricos o por su desplazamiento por la RNA polimerasa (Bøggild, *et al.*, 2012). Este modelo de cooperatividad condicional se ha confirmado con la resolución de la estructura cristalina del complejo RelBE_{Ec} en condiciones de exceso de toxina. La estructura cristalográfica así obtenida se ajusta a un heterotetrámero formado por dos dímeros de antitoxina y dos de toxina (RelB)₂-(RelE)₂ (Bøggild, *et al.*, 2012). El complejo tiene una forma de V muy similar a la descrita para otras antitoxinas y que también recuerda a la estructura del complejo RelBE2*Spn* heterotetramérico resuelto en este trabajo (Figura 62). En el heterotetrámero de *E. coli* la proximidad de los sitios de unión en el DNA haría que dos tetrámeros adyacentes adoptasen una forma de W en la que dos toxinas RelE chocarían y se dificultaría la unión a DNA poniendo de manifiesto la ineficiencia del heterotetrámero para unir DNA. Sólo el heterohexámero sería compatible con la formación de un complejo nucleoproteico estable (Bøggild, *et al.*, 2012).

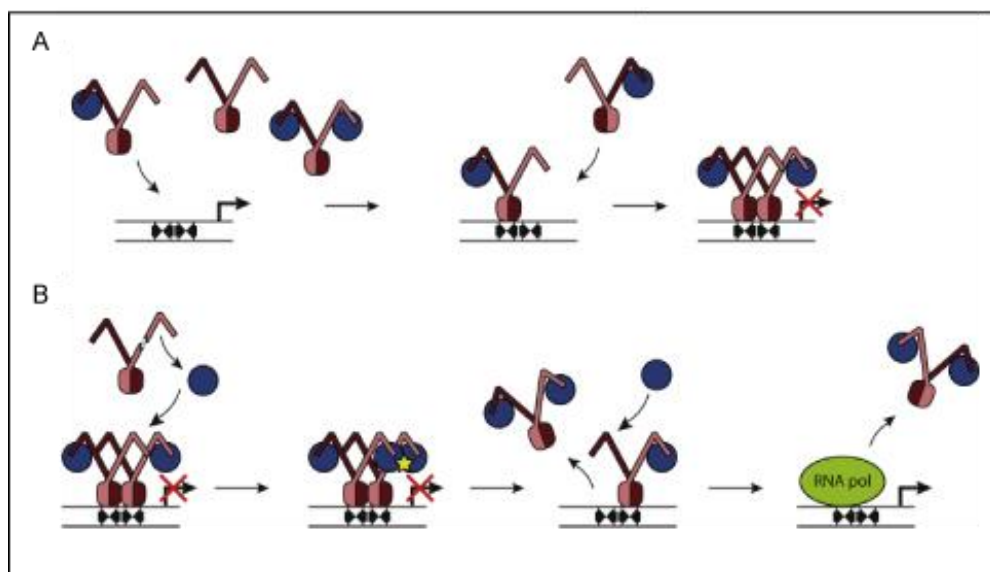


Figura 68. Modelo de cooperatividad condicional propuesto para el sistema RelBE de *E. coli*. (A) Durante el crecimiento normal de las células de *E. coli*, se expresaría en exceso la antitoxina RelB y se formarían diferentes complejos TA, trómeros (RelB)₂RelE y tetrámeros (RelB)₂(RelE)₂, pero solamente un trómero (RelB)₂RelE sería capaz de unirse al DNA operador. La unión de un trómero al DNA operador promovería la unión de un segundo trómero a un sitio adjacente del DNA, formando un heterohexámero RelE-(RelB)₂-(RelB)₂-RelE que bloquearía la transcripción. (B) Bajo condiciones de estrés nutricional, la transcripción estaría reprimida inicialmente pero los niveles de la toxina RelE aumentarían debido a la degradación de la antitoxina. Una molécula de toxina RelE libre se uniría al extremo C-terminal de la antitoxina RelB libre del complejo heterohexamérico unido al DNA operador, produciendo la liberación de un tetrámero RelE-(RelB)₂-RelE. Una segunda molécula de toxina RelE se uniría al trómero (RelB)₂-RelE que permanece unido al DNA, produciendo su liberación debido a cambios alostéricos o siendo desplazado por la RNA polimerasa, permitiendo la transcripción. (Bøggild, *et al.*, 2012).

Por tanto, considerando los datos experimentales y la información disponible sobre la relación entre la estequiometría de los complejos TA y su actividad funcional, las dos asociaciones de RelBE2*Spn* heterohexamérica y heterotetramérica podrían intervenir en mecanismos de regulación transcripcional, como la autorepresión o la cooperatividad condicional. En RelBE2*Spn*, la cooperatividad condicional se podría definir como la capacidad de la toxina y la antitoxina para cooperar en la autorepresión del operón relBE2*Spn*. Esta cooperación podría verse condicionada por las concentraciones relativas de toxina y antitoxina. El heterohexámero, dada su capacidad para unirse a secuencias operadoras en el operón relBE2*Spn*, reduciría los niveles de transcripción del operón, cuando existe un exceso de antitoxina en la célula. Por el contrario, cuando disminuye la síntesis de antitoxina, el complejo heterotetramérico, con capacidad reducida para unirse a DNA, 1) liberaría al operón de la regulación ejercida por el complejo TA y 2) serviría para neutralizar el exceso de toxina libre.

3. PAPEL DE LOS SISTEMAS *RelBE2Spn* y *YefMYoeBSpn* EN LA BIOLOGÍA DEL PNEUMOCOCO

Los sistemas TA cromosómicos están implicados en diferentes procesos fisiológicos y podrían participar en procesos como: i) regulación del crecimiento en condiciones de estrés (Christensen, *et al.*, 2003); ii) muerte celular programada (Engelberg-Kulka, *et al.*, 2006); iii) persistencia (Moyed y Bertrand, 1983; Lewis, 2010), y iv) formación de *biofilms* (Ren, *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2009). Con respecto a la respuesta al estrés, la activación de uno o varios sistemas TA bajo condiciones de limitación de nutrientes puede conducir a la supervivencia de al menos una parte de la población induciendo un estado de dormancia (Christensen, *et al.*, 2001; Pedersen, *et al.*, 2002; Maisonneuve, *et al.*, 2011). En el caso de *S. pneumoniae*, la activación de sistemas TA podría contribuir a la supervivencia de la bacteria en el huésped durante la infección mediante la supresión del crecimiento celular y por tanto, produciendo tolerancia a antibióticos (Nieto, *et al.*, 2010) y escapando de la respuesta inmune del huésped (Baquero, 2009). Se ha propuesto que el aumento de la persistencia de *S. pneumoniae* durante la colonización puede contribuir a su virulencia (Kadioglu, *et al.*, 2008). Además, se ha observado que una estirpe mutante que no expresa la toxina *RelE2Spn*, presenta el mismo perfil de crecimiento en respuesta a la carencia de una fuente de carbono que la estirpe silvestre (Nieto, *et al.*, 2010). Sin embargo, sí se observaron diferencias cuando las células se sometieron a una inhibición de la síntesis de proteínas por ayuno de aminoácidos o por tratamiento antibiótico (Nieto, *et al.*, 2010). Esos resultados indicaron que la activación de *RelE2Spn* conducía a una parada del crecimiento o incluso a la muerte celular (Nieto, *et al.*, 2010). En nuestro presente trabajo para valorar el papel de los sistemas TA pneumocócicos en la biología de la bacteria se han construido mutantes en las estirpes R61 y D39 de *S. pneumoniae* ($\Delta relBE2Spn$, $\Delta yefMYoeBSpn$ y el doble mutante $\Delta relBE2Spn\Delta yefMYoeB$) en los que los genes de los operones *relBE2Spn* o *yefMYoeB* se han reemplazado por un gen de resistencia a cloramfenicol o kanamicina, respectivamente. Analizando los perfiles de crecimiento a 37°C de las estirpes mutantes y silvestres, se observó que ninguna de las mutaciones afectó al crecimiento de *S. pneumoniae* (Figura 51). Tampoco observamos diferencias morfológicas en las células crecidas en medio AGCH, ni en la morfología de las colonias crecidas en placas de agar-sangre (Figuras 52 y 53). Por tanto, los sistemas *RelBE2Spn* y *YefMYoeBSpn* no son esenciales para la viabilidad celular y su pérdida no afecta al crecimiento ni a la morfología de pneumococo. Por otro lado, se estimó el papel de estos sistemas TA cuando las bacterias se someten a condiciones de estrés, producidas por acidificación del medio o por elevada concentración de zinc. La respuesta de los cultivos bacterianos a estas condiciones desfavorables era una parada progresiva del crecimiento celular que mostraba un perfil similar tanto en la estirpe silvestre como en la mutante (Figura 54), indicando que los sistemas *RelBE2Spn* y

YefMYoeB*Spn* no parecen ejercer ningún papel en la regulación del crecimiento ante estas condiciones de estrés. En este sentido, la activación de los sistemas RelBE y MazEF de *E. coli* bajo ayuno de aminoácidos inhibe la síntesis de proteínas afectando a la viabilidad celular (Christensen, *et al.*, 2001; Christensen, *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que la delección de cinco sistemas TA (MazEF, RelBE, ChpBK, YefMYoeB, DinJYafQ) en una estirpe de *E. coli* no produjo diferencias con respecto a la estirpe silvestre en el crecimiento frente a diferentes condiciones de estrés a corto plazo, como ayuno de aminoácidos, acidificación y tratamiento antibiótico (Tsilibaris, *et al.*, 2007). Tampoco se ha encontrado un efecto de los sistemas TA en el crecimiento bajo este tipo de estrés en otras especies, como por ejemplo en *Streptococcus mutans* cuando estirpes en las que se delecionó *mazEF* y *relBE* se sometían a estrés ácido y tratamiento antibiótico (Lemos, *et al.*, 2005). Por lo tanto, estas evidencias ponen de manifiesto que los sistemas TA podrían no ser beneficiosos para la bacteria a corto plazo pero podrían estar implicados en procesos que aseguren una supervivencia a lo largo del tiempo (Tsilibaris, *et al.*, 2007).

Las poblaciones bacterianas sometidas a estrés pueden presentar una distribución biestable, en la que poblaciones genéticamente idénticas que crecen en las mismas condiciones se separan estocásticamente en dos subpoblaciones diferentes. De esta manera, pueden coexistir dos estados semi-estables en la misma población y en el mismo ambiente (Dubnau y Losick, 2006). En bacterias G⁺ el fenómeno de biestabilidad se ha observado en procesos como variación de fase (Saluja y Weiser, 1995), expresión de genes del pilus tipo I (Basset, *et al.*, 2012), persistencia (Leung y Lévesque, 2012), competencia (Claverys, *et al.*, 2006), formación de *biofilm* (Claverys, *et al.*, 2006; Dubnau y Losick, 2006; Claverys y Havarstein, 2007) y para escapar de la esporulación (Claverys, *et al.*, 2006; Dubnau y Losick, 2006; Claverys y Havarstein, 2007). La posible influencia de los sistemas TA de pneumococos en el desarrollo de poblaciones biestables ha sido recientemente discutida por nosotros (Chan, *et al.*, 2012).

La inducción de la competencia para la transformación genética es una respuesta general al estrés en bacterias G⁺ (Claverys, *et al.*, 2006). En nuestro caso, hemos observado que la delección del operón RelBE2*Spn* o del operón YefMYoeB*Spn* condujo a una disminución moderada, pero significativa, de las frecuencias de transformación; esta reducción se hizo más patente cuando se delecionaron los dos sistemas (Tabla 15). Estos resultados sugieren que los sistemas RelBE2*Spn* y YefMYoeB*Spn* participarían en los niveles de competencia y/o transformabilidad de *S. pneumoniae*. En el operón *yefMyoeBSpn* está presente un elemento BOX *upstream* del gene *yefM* (Chan, *et al.*, 2011). La mayoría de los elementos BOX en el genoma de *S. pneumoniae* se encuentran próximos a genes que han sido relacionados con competencia, como *comA* y *hexB* (Chandler y Morrison, 1988; Martin, *et al.*, 1992). La presencia de un elemento BOX puede conducir a *S. pneumoniae* hacia un proceso en el cual una parte de la población entraría en un estado de

competencia para la transformación genética (Claverys, *et al.*, 2006), es decir, a un proceso de biestabilidad.

La formación de *biofilm* constituye una estrategia de supervivencia que facilita la transmisión de patógenos, dotándolos de un ambiente estable protector y actuando como un reservorio para la diseminación de un gran número de microorganismo hacia nuevas superficies (Hall-Stoodley, *et al.*, 2005). La formación de *biofilms* de *S. pneumoniae* parece tener lugar durante la colonización de la nasofaringe y en casos de otitis media recurrente (Hall-Stoodley, *et al.*, 2006; Hoa, *et al.*, 2009). Varios estudios han sugerido que los sistemas TA podrían jugar un papel en la formación de *biofilms*. Se ha observado que el gen *mqsR* se induce en *biofilms* de *E. coli* (Gonzalez Barrios, *et al.*, 2006), y la delección del sistema MqsRA reduce la formación de *biofilms* (Kasari, *et al.*, 2010). La delección conjunta de cinco sistemas TA de *E. coli* (MazEF, RelBE, YefMYoeB, DinJYafQ y ChpBIK) redujo la formación de *biofilms* durante las primeras 8 horas aunque después se recuperó el nivel normal (Kim, *et al.*, 2009). Un segundo estudio independiente ha demostrado que la delección individual de cada uno de los cinco sistemas de *E. coli*, conduce a la reducción en la formación de *biofilms* producida principalmente como resultado de la delección de los sistemas MazEF y DinJYafQ (Kolodkin-Gal y Engelberg-Kulka, 2009). En nuestro caso, observamos una cierta influencia (pequeña, pero estadísticamente significativa) de la delección del operón *yefMYoeBSpn* en la capacidad de las estirpes de pneumococos en la formación de *biofilms*, si bien no observamos un efecto acumulativo al deleccionar a la vez el sistema RelBE2*Spn* (Figura 55). Pensamos que, aunque de manera moderada, el sistema YefMYoeB*Spn* parece jugar un papel en la formación *in vitro* de *biofilms* de *S. pneumoniae*. Por otra parte, estudios epidemiológicos sugieren que durante la colonización de la nasofaringe por parte de *S. pneumoniae* se pueden producir procesos de transformación genética entre las bacterias (Christenson, *et al.*, 1997; Nasrin, *et al.*, 1999; Ronchetti, *et al.*, 1999; Doit, *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha mostrado que durante la formación de *biofilms* de *S. pneumoniae*, los genes relacionados con competencia están sobreexpresados (Oggioni, *et al.*, 2006; Trappetti, *et al.*, 2011). Un estudio reciente ha demostrado que en *biofilms* de *S. pneumoniae* se produce una alta frecuencia de transformación, la cual se asocia con las condiciones ambientales exclusivas de la nasofaringe, como la temperatura (34°C), la limitación de nutrientes y la interacción con las células epiteliales (Marks, *et al.*, 2012). Además se ha observado que la formación de *biofilm* induce una sobreexpresión de los genes de competencia y una disminución en los niveles de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la cápsula. Este cambio en el patrón de expresión puede contribuir al aumento de la frecuencia de transformación durante la colonización de la nasofaringe (Marks, *et al.*, 2012). En nuestro caso, la participación del sistema YefMYoeB*Spn* en la formación de *biofilms* puede estar relacionada con su participación en la transformabilidad genética de *S. pneumoniae* que, a su vez, puede relacionarse

con la presencia de un elemento BOX. En el caso del sistema RelBE2*Spn* no se ha observado un efecto significativo en la formación de *biofilms*, por lo que debe estar involucrado en otros procesos fisiológicos aún no identificados. La importancia de este sistema queda reflejada en que un estudio realizado con alrededor de 100 estirpes procedentes de aislados clínicos y estirpes cuyo genomas están disponibles en las bases de datos mostró que todas contienen un sistema RelBE2*Spn* funcional (Nieto, *et al.*, 2010).

Existen evidencias de que los sistemas TA están implicados en virulencia (Brown, *et al.*, 2004; Harvey, *et al.*, 2011; Mutschler, *et al.*, 2011; Mutschler y Meinhart, 2011; Ren, *et al.*, 2012). Se ha analizado la capacidad de supervivencia de estirpes de *Haemophilus influenzae* en las que se delecionó el sistema VapBC-1, el sistema VapXD o ambos, en un modelo de infección *in vitro* utilizando tejido humano primario del epitelio respiratorio y un modelo *in vivo* utilizando un modelo de otitis media en chinchilla (Ren, *et al.*, 2012). En ambos modelos se observó una atenuación cuando la infección se llevó a cabo con los mutantes, indicando que los sistemas VapBC-1 y VapXD aumentan la capacidad de supervivencia y la virulencia durante la infección de *H. influenzae* (Ren, *et al.*, 2012). El sistema TA en el que se ha descrito con mayor detalle su relación con virulencia es PezAT de *S. pneumoniae*. Estirpes de *S. pneumoniae* en las que se delecionó el gen de la toxina PezT o estirpes silvestres, se inocularon intranasalmente en modelos murinos, comprobándose una atenuación de la infección en aquellos ratones que habían sido inoculados con las cepas mutantes (Brown, *et al.*, 2004). Un estudio adicional comparando el contenido génico de estirpes de *S. pneumoniae* invasivas y no invasivas del serotipo 1, mostró que PezAT se encuentra exclusivamente en la isla de patogenicidad PPI-1 (del inglés “*p*neumococcal *p*athogenicity *i*sland 1”) en las estirpes hipervirulentas y está ausente en la PPI-1 de las estirpes no invasivas o con una virulencia intermedia (Harvey, *et al.*, 2011). La sustitución de la PPI-1 de la estirpe virulenta *S. pneumoniae* D39, que contiene el locus *pezAT*, por la PPI-1 de una estirpe no virulenta, provocó que la estirpe silvestre desplazara a la estirpe mutante en ensayos de competición realizados en lavados nasales, pulmones y sangre de modelos murinos (Harvey, *et al.*, 2011). Además, la sustitución de la PPI-1 de D39 por la de una estirpe hipervirulenta del serotipo 1, produjo una estirpe tan virulenta como la estirpe silvestre (Harvey, *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que el sistema PezAT contribuye a la virulencia de *S. pneumoniae*, aunque no se puede excluir la contribución de otros genes de la PPI-1 ya que en ella el contenido génico residual es altamente variable (Harvey, *et al.*, 2011).

Nosotros, en este trabajo, tratamos de evaluar el papel de RelBE2*Spn* y YefMYoeB*Spn* en la persistencia infectiva, considerada ésta como el aumento de la capacidad que posee *S. pneumoniae* de infectar células eucariotas manteniendo su capacidad de supervivencia. Los ensayos realizados para valorar la persistencia infectiva de las estirpes pneumococicas silvestres y

mutantes para estos sistemas TA no han permitido detectar diferencias entre ellas, en cuanto a la adhesión a células epiteliales o endoteliales humanas. Por lo tanto, serán necesarias nuevas aproximaciones experimentales para obtener un modelo de infección de *S. pneumoniae* con el que evaluar la capacidad de infección ligada a los sistemas TA pneumocócicos.

Por tanto, podemos concluir que los sistemas RelBE2*Spn* y YefMYoeB*Spn* podrían participar en la inducción de la competencia para la transformación genética de pneumococo. Sin embargo, únicamente el sistema YefMYoeB*Spn* parece jugar un papel en la formación de *biofilm* de *S. pneumoniae*.

CONCLUSIONS

This research project has led to the following conclusions:

- Related to the structural analysis:

1. RelB2*Spn* is a small acidic protein that lacks its N-terminal methionine showing a molecular weight of 9,074 Da. The protein has a relatively high occurrence of α -helices and it is partially folded.
2. RelE2*Spn* toxin is a basic small protein that lacks the three first amino acids and which has a molecular weight of 11,163 Da.
3. The RelBE2*Spn* protein complex has a high average of secondary structure, exhibiting a relatively high content in α -helices.
4. The antitoxin RelB2*Spn* shows a relatively high heat stability being less prone to thermal aggregation than the TA complex.
5. In solution, the RelB2*Spn* antitoxin behaves as a dimer whereas the RelBE2*Spn* complex is a heterohexamer. The heterohexamer is composed of two heterotrimers, and the RelBE2*Spn* heterotrimer contains one RelB2*Spn* dimer and one molecule of RelE2*Spn*.
6. The RelBE2*Spn* structure has been solved by X-ray crystallography. The crystals included the two species, heterotetramers and heterohexamers. The RelBE2*Spn* heterotetramer contains two molecules of RelB2*Spn* and two RelE2*Spn* molecules. In these two molecular species, the toxin displays topological similarity to others toxins of the family and to the RNases.
7. The antitoxins in heterotetramers and heterohexamers species exhibit, in their N-terminal region, a RHH motif, similar to other RelB antitoxins. However, each RelB2*Spn* monomer of each trimer in the heterohexamers shows a different fold.

- Related to the functional analysis:

8. The RelB2*Spn* antitoxin is the transcriptional regulator of the *relBESpn* operon. RelB2*Spn* interacts weakly with its DNA target in a dimeric form; however, RelB2*Spn* in complex with RelE2*Spn* binds more efficiently to its DNA operator sequence.
9. The RelBE2*Spn* operator site consists of a 26 bp region that includes the -10 region of the promoter, the transcription initiation site, and two inverted repeats of 3 and 6 bp.

10. The RelBE2*Spn* complex binds as a heterohexamer to the operator sequence. Each heterohexamer includes two heterotrimers composed by one antitoxin dimer and one toxin molecule.
11. The RelBE2*Spn* heterohexamer makes contacts with the DNA-backbone within the *relBE* operator on the same side of the DNA helix covering two consecutive major and minor grooves. The heterohexamer could contact with the DNA through the RHH motifs of each antitoxin dimer.
12. The heterotetramers and heterohexamers would be associated with regulatory mechanism linked to conditional cooperativity.

- Related to the role of RelBE2*Spn* and YefMYoeB*Spn* in the bacteria lifestyle:

13. The RelBE2*Spn* and YefMYoeB*Spn* are not essential, at least under the conditions tested, and their deletion does not affect cell viability, cell morphology or colony formation.
14. The RelBE2*Spn* and YefMYoeB*Spn* systems do not seem to play a role on growth regulation under acidic stress and high zinc concentration.
15. The RelBE2*Spn* system could participate in the induction of competence state for genetic transformation but it does not play a role in the biofilm formation of *S. pneumoniae*.
16. The YefMYoeB*Spn* system participates in genetic transformation and also in formation of biofilms by pneumococcal cells.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, S., Mishra, N. K., Bhatnagar, S. and Bhatnagar, R. (2010). PemK toxin of *Bacillus anthracis* is a ribonuclease. *J Biol Chem* 285(10): 7254-7270.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 6059 - 6063.
- Alonso, J. C., Balsa, D., Cherny, I., Christensen, S. K., Espinosa, M., Francuski, D., Gazit, E., Gerdes, K., Hitchin, E., Martín, M. T., Nieto, C., Overweg, K., Pellicer, T., Saenger, W., Welfle, H., Welfle, K. and Wells, J. (2007). Bacterial toxin-antitoxin systems as targets for the development of novel antibiotics. Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. R. A. Bonomo and M. E. Tolmasey. Washington, DC, ASM Press: 313-329.
- Allegrucci, M. and Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 189: 2030-2038.
- Anantharaman, V. and Aravind, L. (2003). New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: Relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay System. *Genome Biol* 4(R81).
- Andersen, N. E., Gyiring, J., Hansen, A. J., Laursen, H. and Siesjo, B. K. (1989). Brain acidosis in experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 381-387.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J. and Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6: 383-390.
- Andreev, D., Hauryliuk, V., Terenin, I., Dmitriev, S., Ehrenberg, M. and Shatsky, I. (2008). The bacterial toxin RelE induces specific mRNA cleavage in the A site of the eukaryote ribosome. *RNA* 14: 233 - 239.
- Arbing, M. A., Handelsman, S. K., Kuzin, A. P., Verdon, G., Wang, C., Su, M., Rothenbacher, F. P., Abashidze, M., Liu, M., Hurley, J. M., Xiao, R., Acton, T., Inouye, M., Montelione, G. T., Woychik, N. A. and Hunt, J. F. (2010). Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure* 18(8): 996-1010.
- Arkin, M. R. and Wells, J. A. (2004). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 3: 301-317.
- Babu, Y. S., Bugg, C. E., Cook, W. J. (1988). Phases calculated in MLPHARE (Collaborative Computational Proj.). *J Mol Biol*
- Bailey, S. E. S. and Hayes, F. (2009). Influence of operator site geometry on transcriptional control by the YefM-YoeB toxin-antitoxin complex. *J Bacteriol* 191(3): 762-772.
- Balaban, N. Q. (2011). Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr Opin Genet Dev* 21: 168-175.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305(5690): 1622-1625.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J. C., Espinosa, M. and Lacks, S. A. (1986). Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol

- acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene* 41: 153-163.
- Baquero, F. (2009). Environmental stress and evolvability in microbial systems. *Clin Microbiol Infectm* 15: 5-10.
- Basset, A., Turner, K. H., Boush, E., Sayeed, S., Dove, S. L. and Malley, R. (2012). An epigenetic switch mediates bistable expression of the type 1 pilus genes in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 194: 1088-1091.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., and Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148: 71-74.
- Bijlsma, J. J. E., Burghout, P., Kloosterman, T. G., Bootsma, H. J., de Jong, A., Hermans, P. W. M. and Kuipers, O. P. (2007). Development of Genomic Array Footprinting for Identification of Conditionally Essential Genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 73(5): 1514-1524.
- Black, D. S., Kelly, A. J., Mardis, M. J. and Moyed, H.S. (1991). Structure and organization of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* 173(18): 5732-5739.
- Blazewicz, A., Orlicz-Szczesna, G., Prystupa, A., and Szczesny, P. (2010). Use of ion chromatography for the determination of selected metals in blood serum of patients with type 2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol* 24: 14-19.
- Blower, T. R., Fineran, P. C., Johnson, M. J., Toth, I. K., Humphreys, D. P. and Salmond, G. P. C. (2009). Mutagenesis and functional characterisation of the RNA and protein components of the *toxIN* abortive infection/toxin-antitoxin locus of *Erwinia*. *J Bacteriol* 191(19): 6029-6039.
- Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F. and Salmond, G. P. (2011a). A processed non-coding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol* 18: 185-190.
- Blower, T. R., Salmond, G. P. and Luisi, B.F. (2011b). Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners. *Curr Opin Struct Biol* 21(1): 109-118.
- Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C., Luisi, B. F. and Salmond, G. P. (2012). Identification and classification of bacterial type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* 40(13):6158-73.
- Bogaert, D., van Belkum, A., Sluiter, M., Luijendijk, A., de Groot, R., Rümke, H. C., Verbrugh, H. A. and Hermans, P.W. (2004). Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363: 1871-1872.
- Bøggild, A., Sofos, N., Andersen, K. R., Feddersen, A., Easter, A. D., Passmore, L. A. and Brodersen, D. E. (2012). The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* 20: 1641-1648.
- Boynton, T. O., McMurry, J. L. and Shimkets, L. J. (2013). Characterization of *Myxococcus xanthus* MazF and implications for a new point of regulation. *Mol Microbiol* 87(6): 1267-1276.
- Brantl, S. (2012). Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol* 9(12): 1488-1490.
- Bravo, A., de Torrontegui, G. Díaz, R. (1987). Identification of components of a new stability system of plasmid R1, Par D, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* 210: 101-110.

- Brown, B. L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J. M., Davenport, A., Wood, T. K., Peti, W. Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog* 5(12): e1000706.
- Brown, B. L., Wood, T. K., Peti, W. and Page, R. (2011). Structure of the *Escherichia coli* antitoxin MqsA (YgiT/b3021) bound to its gene promoter reveals extensive domain rearrangements and the specificity of transcriptional regulation. *J Biol Chem* 286(3): 2285–2296.
- Brown, J. M. and Shaw, K. J. (2003). A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs. *J Bacteriol* 185: 6600-6608.
- Brown, J. S., Gilliland, S.M., Spratt, B.G. and Holden, D.W. (2004). A locus contained within a variable region of pneumococcal pathogenicity island 1 contributes to virulence in mice. *Infect Immun* 72(3): 1587-1593.
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K. and Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin–antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Res* 40(14):6424-34.
- Claverys, J. P. and Havarstein, L. S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol* 5: 219-229.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M. and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as general stress responses in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 451-475.
- Correia, F. F., D'Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B. L., Makarova, K., Koonin, E. V. and Lewis, K. (2006). Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188(24): 8360-8367.
- Cowtan, K. (2006). The "Buccaneer" protein model building software. *CCP4 Newsletter* 44.
- Croucher, N. J., Fookes, M.C. Perkins, T.T., Turner, D.J., Marguerat, S.B., Keane, T., Quail, M.A., He, M., Assefa, S. and Bahler, J. (2009). A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Res* 37(22): e148.
- Chan, W. T., Moreno-Córdoba, I.; Yeo, C.C. and Espinosa, M. (2012). Toxin-antitoxin genes of the gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*: so few and yet so many. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(4): 773–791.
- Chan, W. T., Nieto, C., Harikrishna, J. A., Khoo, S. K., Yasmin Othman, R., Espinosa, M. and Yeo, C.C. (2011). Genetic regulation of the yefM-yoeBSpn toxin–antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 193: 4612–4625.
- Chandler, M. S. and Morrison, D. A. (1988). Identification of two proteins encoded by *com*, a competence control locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 170: 3136-3141.
- Cherny, I. and Gazit, E. (2004). The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins. *J Biol Chem* 279: 1419-1432.
- Cherny, I., Overgaard, M., Borch, J., Bram, Y., Gerdes, K. and Gazit, E. (2007). Structural and thermodynamic characterization of the *Escherichia coli* RelBE toxin-antitoxin system: indication for a functional role of differential stability. *Biochem* 46(43): 12152-12163.

- Chono, H., Matsumoto, K., Tsuda, H., Saito, N., Lee, K., Kim, S. H., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno, J., Kim, S. H., Inouye, M. and Kato, I. (2011a). Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *Escherichia coli* mRNA interferase. *Hum Gene Ther* 22(1): 35-43.
- Chono, H., Saito, N., Tsuda, H., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno, J. and Kato, I. (2011b). In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PLoS ONE* 6: e23585.
- Christensen-Dalsgaard, M. and Gerdes, K. (2006). Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol Microbiol* 62(2): 397-411.
- Christensen-Dalsgaard, M. and Gerdes, K. (2008). Translation affects YoeB and MazF messenger RNA interferase activities by different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 36(20): 6472-6481.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M. G. and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol Microbiol* 75: 333-348.
- Christensen-Dalsgaard M, Overgaard, M., Winther, K. S. and Gerdes, K. (2008). RNA decay by messenger RNA interferases. *Methods Enzymol* 447: 521–535.
- Christensen, K. S., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gothesman, S., Gerdes, K. and Van Melderen, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the *yefM-yoeB* toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* 51: 1705-1717.
- Christensen, S. K. and Gerdes, K. (2004). Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol Microbiol* 53(2): 587 - 597.
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14328 - 14333.
- Christensen, S. K., Pedersen, K., Hansen, F. G. and Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* 332: 809 - 819.
- Christenson, B., Sylvan, S. P. and Noreen, B. (1997). Carriage of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in the Stockholm area. *Scand J Infect Dis* 29: 555–558.
- Daines, D. A., Jarisch, J. and Smith, A. L. (2007). VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. *J Bacteriol* 189(14): 5041-5048.
- Dalton, K. M. and Crosson, S. (2010). A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex. *Biochemistry* 49(10): 2205-2215.
- Dao-Thi, M. H., Messens, J., Wyns, L. and Backmann, J. (2000). The thermodynamic stability of the proteins of the *ccd* plasmid addiction system. *J Mol Biol* 299: 1373-1386.
- Dao-Thi, M. H., Van Melderen, L., De Genst, E., Afif, H., Buts, L., Lode, W. and Loris, R. (2005). Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. *J Mol Biol* 348: 1091–1102.
- De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H. and Loris, R. (2009). Rejuvenation of CcdB-

- poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Mol Cell* 35: 154–163.
- de la Cueva Méndez, G., Mills, A. D., Clay Farrace, L., Diaz-Orejas, R. and Laskey, R. A. (2003). Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J* 22(2): 246-251.
- de la Hoz, A. B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J. C. and Ceglowski, P. (2000). Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(2): 728-733.
- del Solar, G., Acebo, P. and Espinosa, M. (1997). Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact rnaII region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Mol Microbiol* 23(1): 95- 108.
- del Solar, G., Hernández-Arriaga, A. M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. and Espinosa, M. (2002). A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors in control of plasmid copy number. *J Bacteriol* 184: 4943-4951.
- Diago-Navarro, E., Kamphuis, M. B., Boelens, R., Barendregt, A., Heck, A. J., van den Heuvel, R. H. and Díaz-Orejas, R. (2009). A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry. *FEBS J* 276: 4973-4986.
- Díaz-Orejas, R., Diago-Navarro, E., Hernández-Arriaga, A. M., López-Villarejo, J., Lemonnier, M., Moreno-Córdoba, I., Nieto, C. and Espinosa, M. (2010). Bacterial toxin-antitoxin systems targeting translation. *J Appl Biomed* 8: 179-188.
- Diderichsen, B., Fiil, N. P. and Lavalley, R. (1977). Genetics of the relB locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131: 30-33.
- Doit, C., Picard, B., Loukil, C., Geslin, P. and Bingen E. (2000). Molecular epidemiology survey of penicillin-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from patients with meningitis in France. *J Infect Dis* 181:1971–1978.
- Dörr, T., Vulic, M. and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8(2): e1000317.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* 16: 6127-6145.
- Dubnau, D. and Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* 61: 564-572.
- Edman, P. and Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1: 80-91.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr, Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60: 2126–2132.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. and Hazan, R. (2006). Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* 2(10): e135.
- Engelberg-Kulka, H., Hazan, R. and Amitai, S. (2005). *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J Cell Sci* 118(19): 4327-4332.

- Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S. and Hazan, R. (2004). Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol* 12: 66-71.
- Eyrich, V. A., Martí-Renom, M. A., Przybylski, D., Madhusudhan, M. S., Fiser, A., Pazos, F., Valencia, A., Sali, A. and Rost, B. (2001). EVA: continuous automatic evaluation of protein structure prediction servers. *Bioinformatics* 17(12): 1242-1243.
- Faridani, O. R., Nikraves, A., Pandey, D. P., Gerdes, K. and Good, L. (2006). Competitive inhibition of natural antisense Hok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34(20): 5915-5922.
- Fico, S. and Mahillon, J. (2006). *tasA-tasB*, a new putative toxin-antitoxin (TA) system from *Bacillus thuringiensis* pGI1 plasmid is a widely distributed composite *mazE-doc* TA system. *BMC Genomics* 7(1): 259.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S and Salmond, G. P. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(3): 894 - 899.
- Forte, G., Bocca, B., Senofonte, O., Petrucci, F., Brusa, L., Stanzione, P., Zannino, S., Violante, N., Alimonti, A. and Sancesario, G. (2004). Race and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 111: 1031-1040.
- Fozo, E. M., Hemm, M. R. and Storz, G. (2008). Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(4): 579 - 589.
- Francuski, D. and Saenger, W. (2009). Crystal structure of the antitoxin-toxin protein complex RelB-RelE from *Methanococcus jannaschii*. *J Mol Biol* 393(4):898-908.
- Gabant, P., Szpirer, C. Y., Couturier, M. and Faellen, M. (1998). Direct selection cloning vectors adapted to the genetic analysis of gram-negative bacteria and their plasmids. *Gene* 207: 87-92.
- Gamez, G. and Hammerschmidt, S. (2012). Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Curr Drug Targets* 13: 323-337.
- Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R. D., Charlier, D., van Nuland, N. A. and Loris, R. (2010). Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell* 142: 101-111.
- Garcia-Pino, A., Christensen-Dalsgaard, M., Wyns, L., Yarmolinsky, M. B., Magnuson, R. D., Gerdes, K. and Loris, R. (2008). Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J Biol Chem* 283: 30821-30827.
- Gazit, E. and Sauer, R. T. (1999). The Doc toxin and the Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. *J Biol Chem* 274: 16813-16818.
- Gerdes, K. (2000). Toxin-Antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* 182(3): 561-572.
- Gerdes, K., Bech, F. W., Jorgensen, S. T., Lobner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S. and von Meyenburg, K. (1986a). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product

- of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *Escherichia coli* *relB* operon. *Embo J* 5(8): 2023 - 2029.
- Gerdes, K., Christensen, K. S. and Lobner-Olsen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 3: 371-382.
- Gerdes, K. and Wagner, E. G. (2007). RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* 10(2): 117 - 124.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B. and Molin, S. (1986b). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3116–3120.
- Gerlitz, M., Hrabak, O. and Schwab, H. (1990). Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J Bacteriol* 172: 6194-6203.
- Giudicelli, S. and Tomasz, A. (1984). Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation. *J Bacteriol* 158: 1188–1190.
- Gomis-Rüth, F., Solá, M., Acebo, P., Párraga, A., Guasch, A., Eritja, R., González, A., Espinosa, M., del Solar, G. and Coll, M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J* 17: 7404-7415.
- Gonzalez Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. and Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 188(1): 305 - 316.
- Gotfredsen, M. and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* 29(4): 1065-1076.
- Gotfredsen, M. and Gerdes, K. (2002). Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* 182: 561-572.
- Grady, R. and Hayes, F. (2003). Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol* 47: 1419-1432.
- Grønlund, H. and Gerdes, K. (1999). Toxin-antitoxin systems homologous with *relBE* of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. *J Mol Biol* 285(4): 1401-1415.
- Gvakharia, B. O., Permina, E. A., Gelfand, M. S., Bottomley, P. J., Sayavedra-Soto, L. A. and Arp, D. J. (2007). Global transcriptional response of *Nitrosomonas europaea* to chloroform and chloromethane. *Appl Environ Microbiol* 73: 3440–3445.
- Hall-Stoodley L, H. F., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D. P., Dice, B., Burrows, A., Wackym, P. A., Stoodley, P., Post, J. C., Ehrlich, G. D. and Kerschner, J. E. (2006). Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 296: 202–211.
- Hall-Stoodley L. and Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 13: 7-10.
- Hall-Stoodley L. and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11(7): 1034-1043.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R. and van Melder, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component

- toxin–antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 76: 719-732.
- Hanage, W. P., Fraser, C., Tang, J., Connor, T. R. and Corander, J. (2009). Hyper-Recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science* 324(5933): 1454-1457.
- Hanahan, D. (1983). Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harrison, J. J., Wade, W. D., Akierman, S., Vacchi-Suzzi, C., Stremick, C. A., Turner, R. J. and Ceri, H. (2009). The chromosomal toxin *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6): 2253-2258.
- Harvey, R. M., Stroehrer, U. H., Ogunniyi, A. D., Smith-Vaughan, H. C., Leach, A. J. and Paton, J. C. (2011). A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. *PLoS One* 6(5): e19650.
- Hazan, R., Sat, B. and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol* 186(11): 3663 - 3669.
- Heaton, B. E., Herrou, J., Blackwell, A. E., Wysocki, V. H. and Crosson, S. (2012). Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *J Biol Chem* 287(15): 12098-12110.
- Hoa M, T. S., Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Sachdeva, L., Berk, R. and Coticchia, J. M. (2009). Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73: 1242–1248.
- Hoskins, J., Alborn, W. E. Jr., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P. M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C. A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck, P. R. Jr., Skatrud, P. L. and Glass, J. I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183: 5709-5717.
- Hurley, J. M., Cruz, J. W., Ouyang, M. and Woychik N. A. (2011). Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5'-end of coding regions in vivo. *J Biol Chem* 286: 14770-14778.
- Inouye, M. (2006). The discovery of mRNA interferases: implication in bacterial physiology and application to biotechnology. *J Cell Physiol* 209(3): 670-676.
- Jacobsen, F. E., Kazmierczak, K. M., Lisher, J. P., Winkler, M. E. and Giedroc, D. P. (2011). Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* 3: 38–41.
- Jaffe, A., Ogura, T. and Hiraga, S. (1985). Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *J Bacteriol* 163: 841-849.
- Johnson, W. C. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35: 307-312.

- Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M. and Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol* 191(4): 1191-1199.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. and Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6(4): 288-301.
- Kamada, K. and Hanaoka, F. (2005). Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol Cell* 19(4): 497-509.
- Kamada, K., Hanaoka, F. and Burley, S. K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell* 11: 875-884.
- Kamphuis, M. B., Bonvin, A. M. J. J., Monti, M. C., Lemonnier, M., Muñoz-Gómez, A., van den Heuvel, R. H. H., Díaz-Orejas, R. and Boelens, R. (2006). Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* Toxin-Antitoxin system. *J Mol Biol* 357(1): 115-126.
- Kamphuis, M. B., Monti, M. C., van den Heuvel, R. H. H., Lopez-Villarejo, J., Diaz-Orejas, R. and Boelens, R. (2007). Interactions between the toxin Kid of the Bacterial *parD* system and the antitoxins Kis and MazE. *Proteins* 67: 219-231.
- Kapatral, V., Anderson, I., Ivanova, N., Reznik, G., Los, T., Lykidis, A., Bhattacharyya, A., Bartman, A., Gardner, W., Grechkin, G., Zhu, L., Vasieva, O., Chu, L., Kogan, Y., Chaga, O., Goltsman, E., Bernal, A., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Kyrpides, N. and Overbeek, R. (2002). Genome Sequence and Analysis of the Oral Bacterium *Fusobacterium nucleatum* Strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 184(7): 2005-2018.
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T. and Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* *mqsR* and *ygiT* genes encode a new toxin-antitoxin pair. *J Bacteriol* 192(11): 2908-2919.
- Keck, T., Leiacker, R., Riechelmann, H. and Rettinger, G. (2000). Temperature profile in the nasal cavity. *Laryngoscope* 110: 651– 654.
- Kedzierska, B., Lian, L. Y. and Hayes, F. (2007). Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic Acids Res* 35: 325–339.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271(5251): 990-993.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. and Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230(1): 13-18.
- Khoo, S. K., Loll, B., Chan, W. T., Shoeman, R. L., Ngoo, L., Yeo, C. C. and Meinhart, A. (2007). Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal Toxin-Antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 282(27): 19606-19618.
- Kloosterman, T. G., Witwicki, R. M., van der Kooi-Pol, M. M., Bijlsma, J. J. E. and Kuipers, O. P. (2008). Opposite Effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-Mediated Expression of the Virulence Genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 190(15): 5382–5393.

- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X. S. and Wood, T. K. (2009). Toxin-Antitoxin Systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol* 191: 1258-1267.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X. S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W. and Wood, T. K. (2010). *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. *Environ Microbiol* 12(5): 1105-1121.
- Kim, Y. and Wood, T. K. (2010). Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 209-213.
- Knutsen, E., Johnsborg, O., Quentin, Y., Claverys, J. P. and Havarstein, L. S. (2006). BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development. *J Bacteriol* 188: 8307-8312.
- Kolodkin-Gal, I. and Engelberg-Kulka, H. (2009). The stationary-phase sigma factor σ^S is responsible for the resistance of *Escherichia coli* stationary-phase cells to *mazEF*-mediated cell death. *J Bacteriol* 191: 3177-3182.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S. and Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318(5850): 652-655.
- Korch, S. B., Contreras, H. and Clark-Curtiss, J. E. (2009). Three *Mycobacterium tuberculosis* Rel toxin-antitoxin modules inhibit mycobacterial growth and are expressed in infected human macrophages. *J Bacteriol* 191(5): 1618-1630.
- Korch, S. B., Henderson, T. A. and Hill, T. M. (2003). Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* 50(4): 1199-1213.
- Korch, S. B. and Hill, T. M. (2006). Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: Effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J Bacteriol* 188(11): 3826-3836.
- Kristoffersen, P., Jensen, G. B., Gerdes, K. and Piskur, J. (2000). Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl Environ Microbiol* 66: 5524-5526.
- Kroll, J., Kliner, S., Schneider, C., Voß, I. and Steinbuchel, A. (2010). Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. *Microb Biotechnol* 3: 634-657.
- Kumar, P., Issac, B., Dodson, E. J., Turkenburg, J. P. and Mande, S. C. (2008). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* YefM antitoxin reveals that it is not an intrinsically unstructured protein. *J Mol Biol* 383: 482-493.
- Lacks, S. (1966). Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53: 207-235.
- Lacks, S., López, P., Greenberg, B. and Espinosa, M. (1986). Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J Mol Biol* 192: 753-765.
- Lacks, S. and Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining enzyme activity in pneumococcus. *Biochim Biophys Acta* 39: 508-517.
- Lavalle, R. (1965). New mutants for regulation of RNA synthesis. *Bulletin de la Societe de chimie biologique* 47: 1567-1570.

- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S. and Yarmolinsky, M. B. (1993). Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: *doc*, which causes cell death on curing of prophage, and *phd*, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* 233: 414-428.
- Lehnherr, H. and Yarmolinsky, M. B. (1995). Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3274-3277.
- Lemos, J. A. C., Brown, T. A. Jr., Abranches, J. and Burne, R. A. (2005). Characteristics of *Streptococcus mutans* strains lacking the MazEF and RelBE toxin-antitoxin modules. *FEMS Microbiol Lett* 253(2): 251-257.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P. and van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* 39(13): 5513-5525.
- Leung, E., Datti, A., Cossette, M., Goodreid, J., McCaw, S. E., Mah, M., Nakhamchik, A., Ogata, K., El Bakkouri, M., Cheng, Y. Q., Wodak, S. J., Eger, B. T., Pai, E. F., Liu, J., Gray-Owen, S., Batey, R. A. and Houry, W. A. (2011). Activators of cylindrical proteases as antimicrobials: Identification and development of small molecule activators of ClpP protease. *Chem Biol* 18: 1167-1178.
- Leung, V. and Lévesque, C. M. (2012). A stress inducible quorum sensing peptide mediates the formation of non-inherited multidrug tolerant persister cells. *J Bacteriol* 194: 2265-2274.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry* 70: 267-274.
- Lewis, K. (2010). Persister Cells. *Annu Rev Microbiol* 64: 357-372.
- Li, G. Y., Zhang, Y., Chan, M. C. Y., Mal, T. K., Hoefflich, K. P., Inouye, M. and Ikura, M. (2006). Characterization of dual substrate binding sites in the homodimeric structure of *Escherichia coli* mRNA interferase MazF. *J Mol Biol* 357(1): 139-150.
- Li, G. Y., Zhang, Y., Inouye, M. and Ikura, M. (2008). Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *J Mol Biol* 380(1): 107-119.
- Li, G. Y., Zhang, Y., Inouye, M. and Ikura, M. (2009). Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J Biol Chem* 284(21): 14628-14636.
- Light, R. W., Girard, W. M., Jenkinson, S. G. and George, R. B. (1980). Parapneumonic effusions. *Am J Med* 69: 507-512.
- Lioy, V. S., Pratto, F., de la Hoz, A. B., Ayora, S. and Alonso, J. C. (2010). A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* 63: 31-39.
- Liu, M., Zhang, Y., Inouye, M. and Woychik, N. A. (2008). Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15): 5885-5890.
- Lorenzo-Díaz, F., Solano-Collado, V., Lurz, R., Bravo, A. and Espinosa, M. (2012). Autoregulation of the synthesis of the MobM relaxase encoded by

- the promiscuous plasmid pMV158. *JBacteriol* 1789-1799 doi 1710.1128/JB06827-06811.
- Loris, R., Marianovsky, I., Lah, J., Laeremans, T., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G., Muyldermans, S., Wyns, L. (2003). Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE. *J Biol Chem* 278: 28252–28257.
- Madl, T., van Melder, L., Mine, N., Respondek, M., Oberer, M., Keller, W., Khatai, L. and Zangger, K. (2006). Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *J Mol Biol* 364(2): 170-185.
- Magnuson, R. and Yarmolinsky, M. B. (1998). Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. *J Bacteriol* 180: 6342-6351.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G. and Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(32):13206-11.
- Makarova, K., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct* 4(1): 19.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V. and Koonin, E. V. (2006). The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. *Bioinformatics* 22(21): 2581 - 2584.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (2001). The regulation of the *Escherichia coli mazEF* promoter involves an unusual palindrome. *J Biol Chem* 276: 5975-5984.
- Marks, L. R., Reddinger, R. M. and Hakansson, A. P. (2012). High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 3(5):e00200-12. doi:10.1128/mBio.00200-12.
- Marra, A. (2004). Can virulence factors be viable antibacterial targets? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2(1): 61-72.
- Martin-Galiano, A. J., Overweg, K., Ferrandiz, M. J., Reuter, M., Wells, J. M. and de la Campa, A. G. (2005). Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 151:3935–3946.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J. R., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J. and Claverys, J. P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acid Res* 20: 3479-3483.
- Martínez Llinás, D. (12 de Marzo de 2013). Tesis doctoral: Structural insights into natural transformation and toxin-antitoxin systems. Biochemical and structural characterization of *Neisseria gonorrhoeae* ComE, ComA and DprA and *Streptococcus pneumoniae* RelBE2". Director Miquel Coll. Universitat Autònoma de Barcelona. España.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C. and Wold, A. E. (2008). Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun* 76 4079–4087.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. P. and Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ,

- antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84(5):979-89.
- Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y. and Ohtsubo, E. (1993). *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J Bacteriol* 175: 6850-6856.
- Mattison, K., Wilbur, J. S., So, M. and Brennan, R. G. (2006). Structure of FitAB from *Neisseria gonorrhoeae* bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs. *J Biol Chem* 281(49): 37942-37951.
- Maxam, A. H. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end- labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65.
- McDevitt, C. A., Ogunniyi, A. D., Valkov, E., Lawrence, M. C., Kobe, B., McEwan, A. G. and Paton, J. C. (2011). A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathog* 7(11).
- McEllistrem, M. C., Ransford, J. V. and Khan, S. A. (2007). Characterization of in vitro biofilm-associated pneumococcal phase variants of a clinically relevant serotype 3 clone. *J Clin Microbiol* 45: 97-101.
- Meinhart, A., Alonso, J. C., Strater, N. and Saenger, W. (2003). Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1661-1666.
- Metzger, S., Dror, I. B., Aizenman, E., Schreiber, G., Toone, M., Friesen, J. D., Cashel, M. and Glaser, G. (1988). The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 15699-15704.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Min, A. B., Miallau, L., Sawaya, M. R., Habel, J., Cascio, D. and Eisenberg, D. (2012). The crystal structure of the Rv0301-Rv0300 VapBC-3 toxin-antitoxin complex from *M. tuberculosis* reveals a Mg²⁺ ion in the active site and a putative RNA-binding site. *Protein Science* 21: 1754–1767.
- Mitchell, T. (2000). Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151: 413–419.
- Monti, M. C., Hernandez-Arriaga, A. M., Kamphuis, M. B., Lopez-Villarejo, J., Heck, A. J. R., Boelens, R., Diaz-Orejas, R. and van den Heuvel, R. H. H. (2007). Interactions of Kid-Kis toxin-antitoxin complexes with the *parD* operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid-Kis oligomers. *Nucl Acids Res* 35(5): 1737-1749.
- Moscoso, M., Domenech, M. and García, E. (2010). Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* 77: 1052-1064.
- Moscoso, M., García, E. and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* 188, 7785-7795.

- Mosteller, R. D. (1978). Evidence that glucose starvation-sensitive mutants are altered in the *relB* locus. *J Bacteriol* 133: 1034-1037.
- Motiejunaite, R., Armalyte, J., Markuckas, A. and Suziedeliene, E. (2007). *Escherichia coli* *dinJ-yafQ* genes act as a toxin-antitoxin module. *FEMS Microbiol Lett* 268(1): 112-119.
- Moyed, H. S. and Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155(2): 768-775.
- Muñoz-Elías, E. J., Marcano, J. and Camilli, A. (2008). Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 76: 5049-5061.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst D* 53: 240-255.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L. and Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol* 9(3): e1001033.
- Mutschler, H. and Meinhart, A. (2011). ϵ/ζ systems: their role in resistance, virulence, and their potential for antibiotic development. *J Mol Med* DOI 10.1007/s00109-011-0797-4.
- Mutschler, H., Reinstein, J., Meinhart, A. (2010). Assembly dynamics and stability of the pneumococcal Epsilon Zeta antitoxin toxin (PezAT) system from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 285(28): 21797-21806.
- Nariya, H. and Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA Interferase, mediates programmed cell death during multicellular myxococcus development. *Cell* 132(1): 55-66.
- Nasrin, D., Collignon, P. J., Wilson, E. J., Pilotto, L. S. and Douglas, R. M. (1999). Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from children. *J Paediatr Child Health* 35: 558 –561.
- Neubauer, C., Gao, Y. G., Andersen, K. R., Dunham, C. M., Kelley, A. C., Hentschel, J., Gerdes, K., Ramakrishnan, V. and Brodersen, D. E. (2009). The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* 139: 1084-1095.
- Nieto, C., Cherny, I., Khoo, S. K., García de Lacoba, M., Chan, W. T., Yeo, C. C., Gazit, E. and Espinosa, M. (2007). The *yefM-yoeB* Toxin-Antitoxin Systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: Functional and Structural Correlation. *J Bacteriol* 189(4): 1266-1278.
- Nieto, C., Pellicer, T., Balsa, D., Christensen, S. K., Gerdes, K. and Espinosa, M. (2006). The chromosomal *relBE2* toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* 59(4): 1280–1296.
- Nieto, C., Sadowy, E., de la Campa, A. G., Hryniewicz, W. and Espinosa, M. (2010). The *relBE2Spn* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae* : role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates. *PLoS ONE* 5 (6e11289).
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S. and Cherian, T. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374: 893-902.

- Oberer, M., Lindner, H., Glatter, O., Kratky, C. and Keller, W. (1999). Thermodynamic properties and DNA binding of the ParD protein from the broad host-range plasmid RK2/RP4 killing system. *Biol Chem* 380: 1413-1420.
- Oggioni, M. R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Lannelli, F., Ricci, S., Andrew, P. W. and Pozzi, G. (2006). Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol* 61: 1196 – 1210.
- Ogunniyi, A.D., Mahdi, L.K., Jennings, M.P., McEwan, A.G., McDevitt, C.A., Van der Hoek, M.,B., Bagley, C.J., Hoffmann, P., Gould, K.A., Paton, J. C. (2010). Central role of manganese in regulation of stress responses, physiology, and metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 192: 4489–4497.
- Ogura, T. and Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(15): 4784 - 4788.
- Overgaard, M., Borch, J. and Gerdes, K. (2009). RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon-helix-helix motif in RelB. *J Mol Biol* 394(2): 183-196.
- Overgaard, M., Borch, J., Jorgensen, M. G. and Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol Microbiol* 69: 841 - 857.
- Pabo, C. O. and Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61: 1053-1095.
- Pandey, D. P. and Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucl Acids Res* 33(3): 966-976.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. and Tucker, P. A. (2005). Auto-Rickshaw-An automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Cryst D* 61: 449-457.
- Panjikar S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. and Tucker, P. A. (2009). On the combination of molecular replacement and single anomalous diffraction phasing for automated structure determination. *Acta Cryst D* 65: 1089-1097.
- Park, I. H., Kim, K. H., Andrade, A. L., Briles, D. E., McDaniel, L. S. and Nahm, M. H. (2012a). Nontypeable pneumococci can be divided into multiple *cps* types, including one type expressing the novel gene *pspK*. *mBio* 3: e00035-00012.
- Park, J. H., Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2012b). Intramolecular regulation of the sequence-specific mRNA interferase activity of MazF fused to a MazE fragment with a linker cleavable by specific proteases. *Appl Environ Microbiol* 78(11): 3794-3799.
- Pedersen, K., Christensen, K. S. and Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic conditions by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* 45: 501-510.
- Pedersen, K. and Gerdes, K. (1999). Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32: 1090-1102.

- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K. and Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112(1): 131-140.
- Phizicky, E. M. and Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Am Soc Microbiol* 59: 94-123.
- Provencher, S. W. and Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20: 33-37.
- Pullinger, G. D. and Lax, A. J. (1992). A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Mol Microbiol* 6.
- Ramage, H. R., Connolly, L. E. and Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* 5(12): e1000767.
- Receveur-Bréchet, V., Bourhis, J. M., Uversky, V. N., Canard, B. and Longhi, S. (2006). Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins: Struct Funct Bioinformatics* 62: 24-45.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. and Wood, T. K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(4): 515-524.
- Ren, D., Walker, A. N. and Daines, D. A. (2012). Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol* 12:263.
- Roberts, R. C., Spangler, C. and Helinski, D. R. (1993). Characteristics and significance of DNA binding activity of plasmid stabilization protein ParD from the broad-host-range plasmid RK2. *J Biol Chem* 268: 27109-27117.
- Ronchetti, M. P., Guglielmi, F., Latini, L., Merolla, R., Lorusso, G., Bajaksouzian, S., Villa, M. P., Catania, S., Jacobs, M. R. and Ronchetti, R. (1999). Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* from children in central Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 376-379.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerot, A. M., Biskri, L., Bouie, P. and Mazel, D. (2003). Comparative analysis of superintegrons: Engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res* 13: 428 - 442.
- Ruiz-Cruz, S., Solano-Collado, V., Espinosa, M. and Bravo, A. (2010). Novel plasmid-based genetic tools for the study of promoters and terminators in *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*. *J Microbiol Methods* 83: 156-163.
- Saavedra De Bast, M., Mine, N. and Van Melder, L. (2008). Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. *J Bacteriol* 190(13): 4603-4609.
- Samson, J. E., Spinelli, S., Cambillau, C. and Moineau, S. (2013). Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system. *Molec Microbiol* 87(4):756-68.
- Santos-Sierra, S., Lemonnier, M., Nuñez, B., Hargreaves, D., Rafferty, J., Giraldo, R., Andreu, J. M. and Díaz-Orejas, R. (2003). Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* 50: 120-130.
- Sass, P., Josten, M., Famulla, K., Schiffer, G., Sahl, H. G., Hamoen, L. and Brötz-Oesterhelt, H. (2011). Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP

- peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17474–17479.
- Schmidt, O., Schuenemann, V. J., Hand, N. J., Silhavy, T. J., Martin, J., Lupas, A. N. and Djuranovic, S. (2007). *prfF* and *yhaV* encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 372(4): 894-905.
- Schneider and Sheldrick (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Cryst. D* 58: 1772-1779.
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K. and Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323: 396–401.
- Schuster, C. F. and Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett* doi: 10.1111/1574-6968.12074.
- Sevin, E. W. and Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* 8: R155 (doi:110.1186/gb-2007-1188-1188-r1155).
- Shah, D., Zhang, Z. G., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K. and Lewis, K. (2006). Persisters: A distinct physiological state of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 6: 53.
- Shapira, A., Shapira, S., Gal-Tanamy, M., Zemel, R., Tur-Kaspa, R. and Benhar, I. (2012). Removal of hepatitis C virus-infected cells by a zymogenized bacterial toxin. *PLoS One* 7(2):e32320
- Sheldrick, H., Weeks, M. and Usón (2001). International Tables for Crystallography. Eds. Arnold and Rossmann Vol. F: 333-351.
- Shinohara, M., Guo, J. X., Mori, M., Nakashima, T., Takagi, H., Nishimoto, E., Yamashita, S., Tsumoto, K., Kakuta, Y. and Kimura, M. (2010). The structural mechanism of the inhibition of archaeal RelE toxin by its cognate RelB antitoxin. *Biochem Biophys Res Comm* 400(3): 346-351.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva Méndez, G. and Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(11): 4074-4079.
- Sobecky, P. A., Easter, C. L., Bear, P. D. and Helinski, D. R. (1996). Characterization of the stable maintenance properties of the par region of broad-host-range plasmid RK2. *J Bacteriol* 178: 2086-2093.
- Song, J. H. K., Ko, K.S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., Jeong, J. Y. and Chun, J. (2005). Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells* 19(3): 365-374.
- Sorensen, M. A. (2001). Charging Levels of Four tRNA Species in *Escherichia coli* Rel. and Rel^y Strains during Amino Acid Starvation: A Simple Model for the Effect of ppGpp on Translational Accuracy. *J Mol Biol* 307: 785-798.
- Spaink, H. P., Okker, J. H., Wijffelman, C. A., Pees, E. and Lugtenberg, B. J. J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 27-39.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. and Woody, R. W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8: 370-380.

- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. and Morrison, D. A. (2001). An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5190-5196.
- Suzuki, M., Zhang, J., Liu, M., Woychik, N.A. and Inouye, M. (2005). Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol Cell* 18: 253-261.
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D. and Rowe-Magnus, D.A. (2007). Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Mol Microbiol* 63: 1588-1605.
- Tachdjian, S. and Kelly, R. M. (2006). Dynamic metabolic adjustments and genome plasticity are implicated in the heat shock response of the extremely thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 188: 4553-4559.
- Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I. and Kimura, M. (2005). Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nat Struct Mol Biol* 12: 327-331.
- Tan, Q., Awano, N. and Inouye, M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol* 79: 109-118.
- Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowers, R. N. and Chrzanowska-Lightowers, Z. M. (2010). Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science* 327: 301.
- Terwilliger, T. C. (2000). Maximum likelihood density modification. *Acta Cryst D* 56: 965-972.
- Terwilliger, T. C. (2003). Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Cryst D* 59: 38-44.
- Tian, Q. B., Hayashi, T., Murata, T. and Terawaki, Y. (1996). Gene product identification and promoter analysis of *hig* locus of plasmid Rts. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 679-684.
- Trappetti C, Gualdi, L., Di Meola, L., Jain, P., Korir, C. C., Edmonds, P., Lannelli, F., Ricci, S., Pozzi, G. and Oggioni, M. R. (2011). The impact of the competence quorum sensing system on *Streptococcus pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model. *BMC Microbiol* 11:75.
- Tseng, H. J., McEwan, A.G., Paton, J.C., Jennings, M. P. (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* 70: 1635-1639.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N. and van Melderen, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol* 189(17): 6101-6108.
- Tsuchimoto, S., Nishimura, Y. and Ohtsubo, E. (1992). The stable maintenance system pem of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J Bacteriol* 174: 4205-4211.
- Tullius, T. D., Dombroski, M. E., Churchill, A. and Kam, L. (1987). Hydroxyl radical footprinting: a high-resolution method for mapping protein-DNA contacts. *Meth Enzymol Academic Press, Inc.* 155.

- Usón and Sheldrick (1999). Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 9: 643-648.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* 30: 1022-1025.
- van den Heuvel, R. H., van Duijn, E., Mazon, H., Synowsky, S. A., Lorenzen, K., Versluis, C., Brouns, S. J., Langridge, D., van der Oost, J., Hoyes, J. and Heck, A. J. (2006). Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry. *Anal Chem* 78: 7473-7483.
- van Melderén, L. (2010). Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol* 13: 781-785.
- Van Melderén, L., Bernard, P. and Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol Microbiol* 11: 1151-1157.
- van Melderén, L. and Saavedra de Bast, M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* 5: e1000437. doi:1000410.1001371.
- Vandermeulen, G., Marie, C., Scherman, D. and Preat, V. (2011). New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol Ther* 19(11): 1942-1949.
- Versiek, J. (1985). Trace elements in human body fluids and tissues. *Crit Rev Clin Lab Sci* 22: 97-184.
- Waite, R. D., Penfold, D. W., Struthers, J. K. and Dowson, C. G. (2003). Spontaneous sequence duplications within capsule genes cap8E and tts control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiol* 149 497-504.
- Waite, R. D., Struthers, J. K. and Dowson, C. G. (2001). Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol* 42: 1223-1232.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R. and Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat Chem Biol* 7(6): 359-366.
- Wang, X. and Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl Environ Microbiol* 77(16): 5577-5583.
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R. and Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoTis cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chem Biol* 8: doi: 10.1038/NChemBio.1062.
- Weaver, K. E., Clewell, D. B. and An, F. (1993). Identification, characterization, and nucleotide sequence of a region of *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive plasmid pAD1 capable of autonomous replication. *J Bacteriol* 175(7): 1900-1909.
- Weaver, K. E., Reddy, S. G., Brinkman, C. L., Patel, S., Bayles, K. W. and Endres, J. L. (2009). The identification and characterization of a family of

- toxin-antitoxin systems related to the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 *par* addiction module. *Microbiol* 155(Pt 9): 2930-2940.
- Williams, J. J. and Hergenrother, P. J. (2012). Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends Microbiol* 20: 291-298.
- Winther, K. and Gerdes, K. (2012). Regulation of enteric *vapBC* transcription: Induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res* 40(10):4347-57.
- Winther, K. S. and Gerdes, K. (2009). Ectopic production of VapCs from Enterobacteria inhibits translation and trans-activates YoeB mRNA interferase. *Mol Microbiol* 72(4): 918-930.
- Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2009). mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Prog Mol Biol Transl Sci* 85: 467 - 500.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2009). MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 284(42): 28746-28753.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Ann Rev Genetics* 45: 61-79.
- Yarmolinsky, M. (1995). Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267: 836–837.
- Zhang, J., Zhang, Y. and Inouye, M. (2003). Characterization of the interactions within the *mazEF* addiction module of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278: 32300-32306.
- Zhang, Y. and Inouye, M. (2009). The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J Biol Chem* 284: 6627-6638.
- Zhao J, Wang, Q., Li, M., Heijstra, B. D., Wang, S., Liang, Q., Qi, Q. (2013). *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. *Microbiol* 159(Pt 3):633-40.

APÉNDICE: PUBLICACIONES

The toxin–antitoxin proteins RelBE2*Spn* of *Streptococcus pneumoniae*: Characterization and association to their DNA target

Inma Moreno-Córdoba,¹ Elizabeth Diago-Navarro,¹ Arjan Barendregt,² Albert J. R. Heck,² Carlos Alfonso,¹ Ramón Díaz-Orejas,¹ Concha Nieto,^{1*} and Manuel Espinosa^{1*}

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

² Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Group, Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH, Netherland Proteomics Centre, The Netherlands

ABSTRACT

The chromosome of the pathogenic Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* contains between six to 10 operons encoding toxin–antitoxin systems (TAS). TAS are widespread and redundant in bacteria and archaea and their role, albeit still obscure, may be related to important aspects of bacteria lifestyle like response to stress. One of the most abundant TAS is the *relBE* family, being present in the chromosome of many bacteria and archaea. Because of the high rates of morbidity and mortality caused by *S. pneumoniae*, it has been interesting to gain knowledge on the pneumococcal TAS, among them the RelBE2*Spn* proteins. Here, we have analyzed the DNA binding capacity of the RelB2*Spn* antitoxin and the RelB2*Spn*–RelE2*Spn* proteins by band-shift assays. Thus, a DNA region encompassing the operator region of the proteins was identified. In addition, we have used analytical ultracentrifugation and native mass spectrometry to measure the oligomerization state of the antitoxin alone and the RelBE2*Spn* complex in solution bound or unbound to its DNA substrate. Using native mass spectrometry allowed us to unambiguously determine the stoichiometry of the RelB2*Spn* and of the RelBE2*Spn* complex alone or associated to its DNA target.

Proteins 2012; 80:1834–1846.
© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: pneumococcal RelB and RelE proteins; protein–protein interactions; protein–DNA interactions; native mass spectrometry; analytical ultracentrifugation.

INTRODUCTION

Type II (proteic) toxin–antitoxin systems (TAS) are generally constituted by two components: a stable toxin that inhibits cellular growth and its cognate labile antitoxin that prevents the cytotoxic effect of the toxin by direct protein–protein interactions. Under conditions that subject the cells to stress, host-encoded proteases degrade the antitoxin, releasing the free toxin that will halt bacterial cell growth and, eventually, would cause bacterial death. The ubiquity and redundancy of TAS in the genomes of bacteria and archaea are amazing and their number has been steadily increasing as the number of sequenced microbial genomes has increased, thus making TAS a subject of very active research.^{1–3} Type II TAS have been commonly divided into 10 families based on homologies among the toxins.⁴ However, a new informatics approach has identified up to 18 antitoxins and 23 toxins sequences from different bacterial species.⁵ The

TA operons are regulated by the binding of the antitoxin to an operator region located nearby or within the promoter of the operon. The antitoxin by itself binds poorly to its DNA target, but the TA complex generated by antitoxin–toxin interactions increases the strength of binding leading to efficient self-regulation of its cognate operon.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: European Union (CAREPNEUMO); Grant number: EU-CP223111 (to ME); Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Innovation; Grant number: BFU2010-19597 (ME); Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Innovation; Grant number: CSD2008-00013 (INTERMODS, ME and RDO); Grant sponsor: European Union 7th Framework Programme (PRIME-XS project); Grant number: 262067 (AJH)

*Correspondence to: Manuel Espinosa or Concha Nieto, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, E-28004 Madrid, Spain. E-mail: mespinosa@cib.csic.es or cnieto@cib.csic.es

Received 2 November 2011; Revised 21 March 2012; Accepted 23 March 2012
Published online 10 April 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/prot.24081

Toxin-Antitoxin Genes of the Gram-Positive Pathogen *Streptococcus pneumoniae*: So Few and Yet So Many

Wai Ting Chan,^a Inma Moreno-Córdoba,^a Chew Chieng Yeo,^b and Manuel Espinosa^a

Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain,^a and Faculty of Agriculture and Biotechnology, Universiti Sultan Zainal Abidin, Kampus Gong Badak, Kuala Terengganu, Malaysia^b

INTRODUCTION	773
BACTERIAL TAS: WHAT ARE THEY REALLY FOR?	774
TAS IN <i>S. PNEUMONIAE</i> : SO FEW	775
GENETIC ORGANIZATION AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION	776
FUNCTIONALITY	777
STRUCTURAL INFORMATION	778
TAS IN THE GENOME OF <i>S. PNEUMONIAE</i> : AND YET SO MANY	779
RelBE1 and RelBE2	779
The Peculiar Xre-COG2856 TAS	781
The Paradoxical Xre-Bro TAS	783
The Enigmatic BOX Elements	783
DO PNEUMOCOCCAL TAS PLAY A ROLE IN THE BACTERIAL LIFE-STYLE?	784
Persistence	784
Bistability	785
CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES: USE OF TAS AS ANTIMICROBIALS	786
ACKNOWLEDGMENTS	787
REFERENCES	788

INTRODUCTION

Among diseases caused by bacterial pathogens, those originating from Gram-positive (G^+) bacteria, particularly *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*, pose a major threat to the human population because of their high rates of morbidity and mortality, economic impact, role as reservoirs of antibiotic resistance (3), and virulence genes that are horizontally spread (6, 143). These three bacteria cause many nosocomial diseases, show elevated levels of resistance to antibiotics, and play a key role in the spread of resistance (76).

S. pneumoniae (the pneumococcus) is the causal agent of pneumococcal pneumonia, of more than 50% of meningitis cases, and also of sepsis, otitis media, and other less serious infections. Pneumococcal infections are a major cause of mortality worldwide, with recent estimates that pneumonia kills approximately 1.4 million children under the age of 5 years annually, more than AIDS, malaria, and tuberculosis combined (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/index.html>) (100). In the United States and Europe, the annual incidence of invasive pneumococcal disease ranges from 10 to 100 cases per 100,000 population (<http://www.who.int/ith/diseases/pneumococcal/en/index.html>). Infections by *S. pneumoniae* in these countries are the most common causes of community-acquired bacterial pneumonia in adults. The rate of carriage of the bacteria varies between 5% and 70% depending upon age, geographic area, and socioeconomic conditions (14). In general, newly acquired pneumococcal colonization of the nasopharynx of healthy individuals is not associated with the development of disease. However, it is a source of the constant presence of the bacteria within the human population, which in turn would result in continued transmission. It is when the host immunological system is compromised or when a more virulent

variant is acquired that mild to serious diseases would appear (112).

Understandably enough, there is an urgent need to find novel targets to tackle pneumococcal infections. Several strategies, not mutually exclusive, have been proposed for dealing with pneumococcal infections. First, the development of new antibiotics (<http://www.who.int/bulletin/volumes/89/2/11-030211/en/index.html>) or the employment of rotation schemes for the use of known antibiotics has been proposed as a measure to prevent the spread of resistance, the idea being that the alleviation of the selective pressure for a particular antibiotic will lead to the elimination of antibiotic-resistant bacteria from the environment (4). However, studies on the fitness of antibiotic-resistant bacteria indicated that when the numbers of resistant cells increase above a threshold level, they are likely to remain there for a long time (5). In addition, the pneumococcus is naturally transformable with exogenous DNA, and horizontal DNA transfer among closely related streptococci is evident from the mosaic structure of certain virulence factors, such as the choline- and penicillin-binding proteins (106). Thus, the therapy of pneumococcal diseases is hampered by the increasing prevalence of antibiotic-resistant strains and the suboptimal clinical efficacy of the available vaccines. Vaccination has greatly reduced the number of pneumococcal infections, but it has also led to the selection of serotypes for which there are no available vaccines (serotype replacement). In addition to that, the numbers of clinical isolates of *S. pneumoniae* that exhibit antibiotic resis-

Address correspondence to Chew Chieng Yeo, chewchieng@gmail.com, or Manuel Espinosa, mespinosa@cib.csic.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/MMBR.00030-12

tances have also increased during the past decade (55). Other proposed strategies include the targeting of key virulence factors (101), the inhibition of gene spread by the discovery of conjugation inhibitors (50), bacteriophage therapy, and the use of genomic approaches to identify genes that are essential for microbial survival or virulence. Now that the sequences of a large number of pneumococcal genomes are completed or are under way, it will be possible to search for genes conserved among these bacterial isolates and relate them to other bacteria that can survive in similar sites within the human microbiome: these might represent potential targets for antimicrobials. Furthermore, the profiling of a large cohort of patients based on their metagenome will facilitate the findings of the functional compositions of microbiomes within the human populations and, in turn, will help to find associations between healthy and diseased individuals, to find patterns in host-microbe interactions and immune system responses.

The use of naturally occurring peptide antibiotics or peptide-based inhibitors as design templates for the synthesis of compounds with similar physicochemical properties is also an approach used in pharmaceutical research (7). Finally, the employment of molecules designed to take advantage of the choline-containing cell wall of pneumococcal cells has been used to develop pneumococcus-specific inhibitors of cell growth by mimicking the specific feature of the presentation of choline residues in the cell wall. Molecules termed dendrimers have been successfully employed to develop pneumococcus-specific inhibitors of cell growth by mimicking the specific feature of the presentation of choline residues in the cell wall, yielding very interesting antipneumococcal molecules (71).

The use of the toxin proteins from the toxin-antitoxin (TA) systems (TAS) as potential targets for the development of new antibacterials has also been proposed (4, 114), since TAS are found in a large number of prokaryotes but not in eukaryotes (90, 122). TA pairs are usually organized as a single operon of two genes: the toxin gene encodes a relatively stable protein, whereas the antitoxin gene either encodes a labile antitoxin protein or is transcribed but remains untranslated as RNA (59, 61). Under steady-state conditions, the toxin is neutralized by the antitoxin, generating a harmless complex which autoregulates their synthesis. However, under certain circumstances, such as nutritional stress, one or more TA operons will be triggered, in which the antitoxin, which is more labile, will be degraded more rapidly, leaving the toxin protein to act on its cellular target. Genes encoding chromosomal TA pairs are also potential targets for the development of drugs that would interfere with the ability of pneumococci to adapt to those stresses (150).

In this review, we focus on the TA genes of *S. pneumoniae* because they constitute a fairly unexplored world: only three pneumococcal TA pairs, namely, RelBE2, PezAT, and YefM-YoeB, have been studied so far, and only the PezAT TA pair has been characterized in terms of structure and function (21, 82, 113, 117). Surprisingly enough, an in-depth study of possible TAS present in the genomes of pneumococcal strains that have been sequenced showed that their number is far larger than envisaged (90), and our results presented here show that their number can be even larger. Furthermore, the highly recombinogenic nature of this bacterium has apparently led to novel putative TAS with genetic organizations not previously reported (see below).

BACTERIAL TAS: WHAT ARE THEY REALLY FOR?

TAS can be broadly classified into three types (schematically depicted in Fig. 1). In type I systems, the antitoxin is an antisense

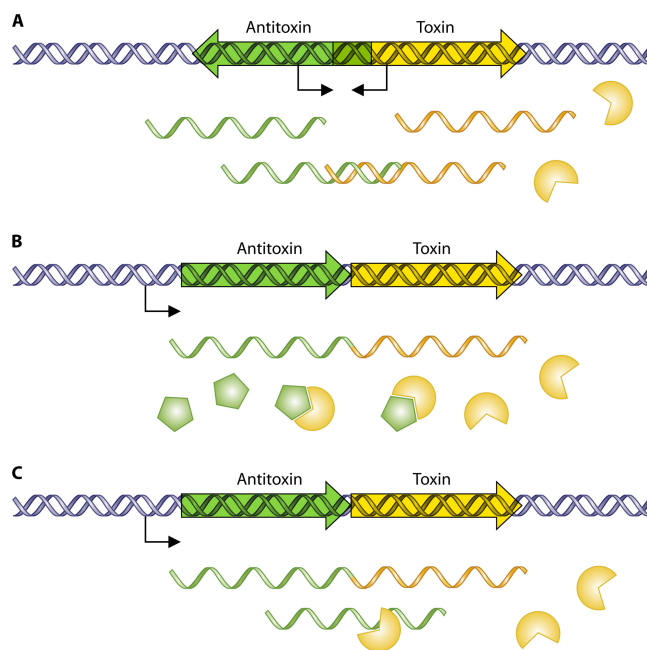


FIG 1 Classification of TAS. (A) Type I TAS. Several genetic organizations of this type have been reported (52, 61), and one of the examples is shown here: the two genes encoding the antitoxin and the toxin are organized in opposite orientations, and they are transcribed individually from their own promoters. The antitoxin is an antisense mRNA which prevents the translation of the toxin (a protein). (B) Type II (proteic) TAS. Both TA genes are arranged as an operon, with the antitoxin gene usually preceding the toxin gene. The two genes encoding the TAS are cotranscribed as a single mRNA transcript from the promoter(s), which is placed upstream of the antitoxin gene and subsequently translated. The antitoxins counteract the toxic effect of the cognate toxins by binding avidly to the toxin protein, thus neutralizing the toxic effect. (C) Type III TAS. The organization of both TA genes is the same as that of type II TAS, but instead of protein-protein interactions, the toxin protein is inactivated by the antitoxin mRNA. Green indicates the antitoxin components, whereas beige indicates the toxin components.

RNA that prevents the translation of the toxin by binding to its complementary toxin mRNA (Fig. 1A). Different variations on the theme can also exist, as shown by recent reviews (52, 61). In type II (proteic) systems, both toxin and antitoxin proteins will be translated, and the antitoxin protein neutralizes the toxin by forming a tight innocuous complex with the toxin protein (Fig. 1B) (68). A type III TA was recently described, whereby the antitoxin RNA inactivates the toxin protein by direct RNA-protein interactions (Fig. 1C) (51).

The last decade has seen a tremendous increase in publications and citations of TAS, as these systems have been associated with many important bacterial processes. TAS were initially reported to exist on plasmids, where they function to mediate plasmid maintenance via postsegregational killing (15, 16, 38, 60), although more subtle processes, like the coupling of plasmid replication and maintenance, have been shown for the plasmid R1-harbored *kis-kid* TAS (97). However, when TA genes are chromosomally carried, their function seems to be varied and debatable. Chromosomal TAS were shown, at least, to be involved (i) in the stress response (27), (ii) in programmed cell death (44), (iii) in persistence and antibiotic tolerance (92, 108), (iv) as antiaddiction modules (131), (v) as phage abortive infection systems (51), and (vi) in the maintenance of integrative conjugative elements (152),

a function which mirrors that of their plasmid-borne counterparts. Perhaps, the function of the chromosomal TA genes cannot be generalized, as these would likely depend on where the locus resides in the genome, its mode of action, and whether it imparts a selective advantage to its host.

A number of cellular targets for the type II toxins have been elucidated, and intriguingly, most of these toxins function as translational inhibitors, with the majority acting as endoribonucleases, and are termed mRNA interferases (69, 154). The TAS mRNA interferases can be classified into two groups: (i) the ribosome-dependent mRNA interferases, which cleave mRNAs at the ribosomal A site and are typified by the RelE toxin (125), and (ii) the ribosome-independent mRNA interferases, which are typified by the MazF toxin (110, 155, 159). Other toxins, such as Doc and RatA, inhibit translation through binding with the 30S and 50S ribosomal subunits, respectively (96, 158), whereas HipA was suggested to inhibit translation through the phosphorylation of elongation factor Tu (134), and the VapC toxin specifically cleaves within the stem-loop region of the initiator tRNA^{fMet} (151). Other targets of type II toxins include DNA gyrase (12, 31, 34, 145), topoisomerase I (73), cytoskeletal proteins (139), and cell wall assembly via peptidoglycan synthesis (113).

Bioinformatics approaches indicated that TAS are abundant in both bacterial and archaeal genomes. Some bacteria, like *Mycobacterium tuberculosis*, harbor at least 80 TAS in their genomes (126), while *Escherichia coli* K-12 harbors at least 36, at the last count (155). The numbers of type II TAS were also found to vary between isolates from the same species, indicating that they are likely to move from one genome to another via horizontal gene transfer (90, 122). The presence of so many TAS in a single bacterium is ambiguous, and whether they cross talk remains to be elucidated, although recent reports suggested the possibility of a coordinated regulation of a network of TAS under various stress conditions (155, 156, 160).

The last few years have seen an explosion in the number of TAS that have been discovered. Six years ago, type II TA pairs could be classified into eight toxin families (58), and later on, the number of toxin families was increased to 10 (146). A more recent thorough bioinformatics search resulted in the discovery of many more novel toxins and antitoxins, a few of which were experimentally validated by using a simple killing-rescue assay; i.e., the expression of the putative toxins led to growth inhibition, while the coexpression of the putative cognate antitoxins restored normal growth (90). In a more recent paper, type II toxins were classified into 12 toxin superfamilies, whereas antitoxins were grouped into 20 superfamilies. These toxin and antitoxin families were observed to have originated from distinct ancestors and have likely been assembled multiple times during the course of evolution, indicating that they might be selfish DNA sequences, as suggested by Leplae et al. (90).

Chromosomal TAS of Gram-negative (G^-) bacteria, particularly those of *E. coli*, have been well studied. In the *E. coli* K-12 genome, there are at least 11 type II TA loci that have been functionally characterized, namely, *relBE* (64), *dinJ-yafQ* (107), *yefM-yoeB* (23), *prfF-yhaV* (133), *mazEF* (2), *chpSB* (103), *hicAB* (77), *hipBA* (86), *yafNO*, *higBA* (*ygiNM*), and *ygiUT* (*mqsR-mqsA*) (28). Even though TAS of G^+ bacteria are also widely distributed and have been found in both chromosomes and plasmids, they are comparatively less well characterized. For instance, some of the well-studied TA genes of G^- bacteria have also been discovered in

G^+ bacteria, such as *mazEF* in *S. aureus* (40) and *relBE* and *yefM-yoeB* in *S. pneumoniae* (117). Nevertheless, there are cases in which specific TAS seem to play different roles in G^+ and in G^- bacteria: the *epsilon-zeta* TA cassette stabilizes plasmids in *E. coli* less efficiently than in *Bacillus subtilis*. Moreover, the expression of the Zeta toxin was shown to be bactericidal for *B. subtilis* but bacteriostatic for *E. coli* (161).

TAS IN *S. PNEUMONIAE*: SO FEW

The number of TAS reported to exist in *S. pneumoniae* was relatively small, with at most five in strain R6 and six in virulent strain TIGR4, when they were first reported in 2005 to 2006 (117, 122). About 4 years later, the number was increased to up to eight TAS in the genome of *S. pneumoniae* (118). However, as we discuss below, these figures are an underestimation of the number and, most importantly, the complexity of the pneumococcal TAS. Data mining of the increasing number of pneumococcal genomes available has shown that the number of type II TAS in *S. pneumoniae* is indeed large. In addition to the well-studied two-component (toxin and antitoxin) TAS, namely, *relBE*, *yefM-yoeB*, and *pezAT*, we have found here an intriguing number of the so-called three-component TAS and even more complex organizations (see below). Furthermore, in the case of *S. pneumoniae*, we propose that at least some of its chromosomal TA genes cannot be considered “selfish,” but rather, they might play an important role in the pneumococcal life-style (see below). To date, only three chromosomal pneumococcal TA operons have been studied in some detail, namely, *relBE2* (GI 15903147 and 15903146 in the R6 genome), *pezAT* (GI 15902995 and 15902996 in the R6 genome), and *yefM-yoeB* (GI 15903628 and 15903627 in the R6 genome).

In the case of the pneumococcal *relBE* genes, analyses performed on bacterial genomes showed the existence of two putative pneumococcal toxin genes that shared homologies to the *E. coli* *relE* gene; the toxin genes were preceded by putative antitoxin (*relB*) counterparts, and the TA loci were termed *relBE1* and *relBE2* (122). The percent similarities observed for the RelE toxins were relatively high: 43% (*E. coli* RelE and pneumococcal RelE1), 51% (*E. coli* RelE and pneumococcal RelE2), and 50% (pneumococcal RelE1 and RelE2). The putative antitoxins also exhibited significant sequence similarities: 52% (*E. coli* RelB and pneumococcal RelB1), 34% (*E. coli* RelB and pneumococcal RelB2), and 39% (pneumococcal RelB antitoxins). The sequence similarities of the antitoxins presently found by us support the keeping of the name of the pneumococcal *relBE* TA genes (4, 39, 118), in spite of some reluctance by others (90). The pneumococcal *relBE2* genes were shown to be functional (117), but this was reportedly not the case for *relBE1* (GI 15902296 and 15902297 in the R6 genome). The latter TA pair was shown to be unable to cleave mRNA after the induction of transcription of the pneumococcal *relE1* gene in *E. coli* (26); however, we still cannot rule out the functionality of the pneumococcal *relBE1* genes, as an assessment of the cell growth profile after the overexpression of the *relE1* gene was not conducted (26, 117). The chromosomal *pezAT* (pneumococcal *epsilon-zeta* antitoxin-toxin) genes were named after their homologue, the *epsilon-zeta* TAS, which was discovered in plasmid pSM19035 of *Streptococcus pyogenes* (18, 20, 82). Finally, the pneumococcal *yefM-yoeB* TAS showed homology to the *E. coli* counterpart (116, 122) as well as to the *axe-txe* TAS of plasmid pRUM of *Enterococcus faecium* (65, 116). These three functional pneumococcal TA pairs (*relBE2*, *pezAT*, and *yefM-yoeB*) are re-

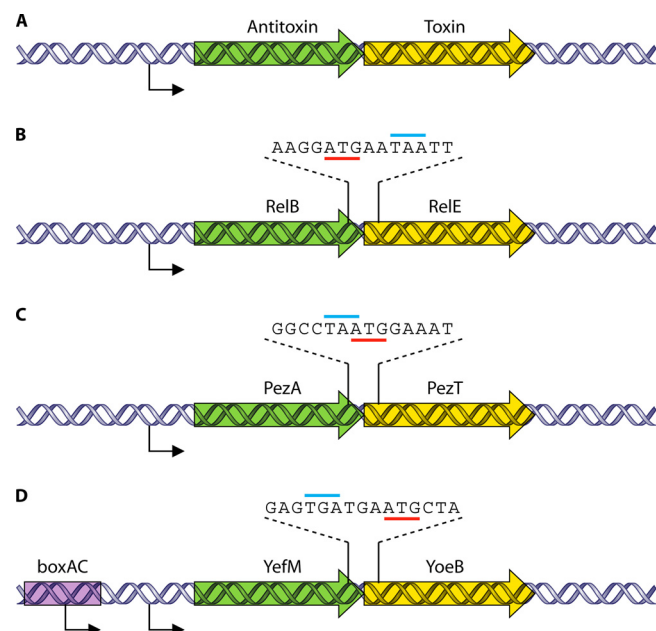


FIG 2 Genetic organization of pneumococcal type II TAS. (A) Typical organization of type II TAS, in which the antitoxin gene precedes the toxin gene and both genes constitute an operon. Both genes usually overlap by 1 to 4 nt and are cotranscribed from a single promoter located upstream of the antitoxin gene. The transcription of the operon is negatively autoregulated by the TA protein complex. (B to D) The organization of the three studied pneumococcal TAS is similar to that of the typical type II TAS: the genes overlapped by 8 nt (*relBE2*) (B) or by 1 nt (*pezAT* TA genes) (C) or were separated by 3 nt (*yefM-yoeB* TA genes) (D). The *yefM-yoeB* TAS (D), however, is somewhat dissimilar to the other two pneumococcal TAS, as this operon is transcribed from two promoters: P_{yefM2} is regulated by the YefM and YoeB proteins, and P_{yefM1} , which is located upstream of P_{yefM2} , is 15-fold weaker than P_{yefM2} , but it is a constitutive, unregulated promoter. In addition, a *boxAC* element (purple rectangle) is found to overlap the -35 sequence of P_{yefM1} . The antitoxin and toxin genes are indicated in green and beige, respectively. The lines indicate the start (red) and stop (cyan) codons.

viewed below in terms of their genetic organizations, their transcriptional regulation, their functional activities, and, finally, the available details on their structures.

GENETIC ORGANIZATION AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION

The three pneumococcal TAS, as is usual in most (but not in all) systems, are organized as operons of two genes in which the antitoxin gene precedes the toxin gene (Fig. 2A). Sequence analyses of the region between the antitoxin and the toxin genes in the three pneumococcal TA pairs showed an organization indicative of translational coupling (Fig. 2). In *relBE2*, the *relB2* antitoxin gene overlaps the *relE2* toxin gene by 8 nucleotides (nt) (Fig. 2B), and in *pezAT*, the TAA stop codon of the *pezA* antitoxin gene overlaps the ATG initiation codon of the *pezT* toxin gene (Fig. 2C). In the case of *yefM-yoeB*, there are two stop codons of the *yefM* antitoxin gene followed by the ATG start codon of the *yoeB* toxin gene (Fig. 2D).

The *relBE2* promoter region (Fig. 3A) contains two short inverted repeats (IR-1 and IR-2) that span nucleotides -16 to $+6$ (with position $+1$ being the nucleotide where transcription initiates). The right and left arms of IR-1 and IR-2, respectively, overlap the -10 region of the single promoter P_{rel} (117). Electrophoretic mobility shift assays showed that the antitoxin RelB2 and the RelB2-RelE2 protein complex bind to a DNA fragment containing

this region, which is indicative of the existence of an operator that has not been characterized further so far (105). A putative Shine-Dalgarno (SD) sequence, which complies with the reported consensus sequence for *S. pneumoniae* (Chang Bioscience), was located at position $+11$.

The *pezA* and *pezT* genes are cotranscribed from a single promoter located upstream of *pezA* (Fig. 3B). Their homologues, epsilon-zeta of plasmid pSM19035 together with its upstream gene *omega*, are a three-component TAS in which the transcription of the whole operon is regulated by the Omega repressor protein (36). Neither the Epsilon antitoxin nor the Zeta toxin is involved in the regulation of this operon, although there is a weak promoter detected upstream of the *epsilon* gene (20, 35). Unlike the Epsilon antitoxin, PezA functions as a repressor that binds to a 56-bp-long palindrome sequence located upstream of the *pezA* gene. This imperfect palindrome encompasses nearly the entire promoter of the operon. Although no detailed analyses have been performed on the contacts between the PezA protein and its DNA target, all or part of the palindrome could be the target of the antitoxin, whereas PezT serves as a corepressor in a PezA-PezT complex to further repress the *pezAT* promoter (82). The Epsilon-Zeta genetic module was initially presumed to be restricted to G^+ bacteria (104), but homologues of the Epsilon-Zeta systems are now known to be widely distributed among bacterial phyla (90). Close homologues of PezT are chromosomally encoded and associated with PezA-like antitoxins, with no homologues of the Omega repressor to be found elsewhere in their respective genomes, and therefore, they constitute a classical two-component TAS. Likewise, nearly all homologues that are more closely related to the pSM19035-encoded Zeta toxin are associated with Epsilon-like antitoxins along with Omega-like repressors and thus form a three-component Omega-Epsilon-Zeta TAS. A third group of PezT/Zeta-like proteins is both chromosomally and plasmid encoded and shares between 30 and 40% sequence identity with Zeta as well as PezT. Besides a lack of an apparent antitoxin homologue, another distinctive feature of this third group of Zeta-like proteins is their size, which, at more than 500 amino acid residues, is around twice the size of Zeta (287 residues) and PezT (253 residues). The functionality of these apparently solo Zeta-like proteins has yet to be determined.

The pneumococcal *yefM-yoeB* TA pair was initially proposed to be designated *relBE3* due to its low-level but significant similarity to the *E. coli* *relBE* system (58); however, we preferred to name it *yefM-yoeB* in previous work (21, 116) and in this review. In addition to the low level of similarity between the gene products (38% between the *E. coli* RelB and the pneumococcal YefM proteins and 33% for the *E. coli* RelE and the pneumococcal YoeB proteins), differences also exist in the promoter regions. This is reflected mostly by the pneumococcal *yefM-yoeB* operon, in which a pneumococcal BOX element (32, 102) was inserted upstream of the “natural” promoter, generating a second promoter which is not regulated by the TA protein complex (Fig. 3C). Compared to other TA operons, the regulation of the pneumococcal *yefM-yoeB* operon is atypical because of the insertion of this putative mobile sequence, designated the *boxAC* element, upstream of its main promoter (Fig. 3C). BOX elements are abundant repeated sequences that are placed within the intergenic regions of the genome of *S. pneumoniae*, and the presence of these BOX elements was proposed to affect the expressions of neighboring genes (102). Without this element, the regulation of *yefM-yoeB* appears to be similar to those of other TA pairs in which the YefM antitoxin serves as a repressor of this operon by binding to a pal-

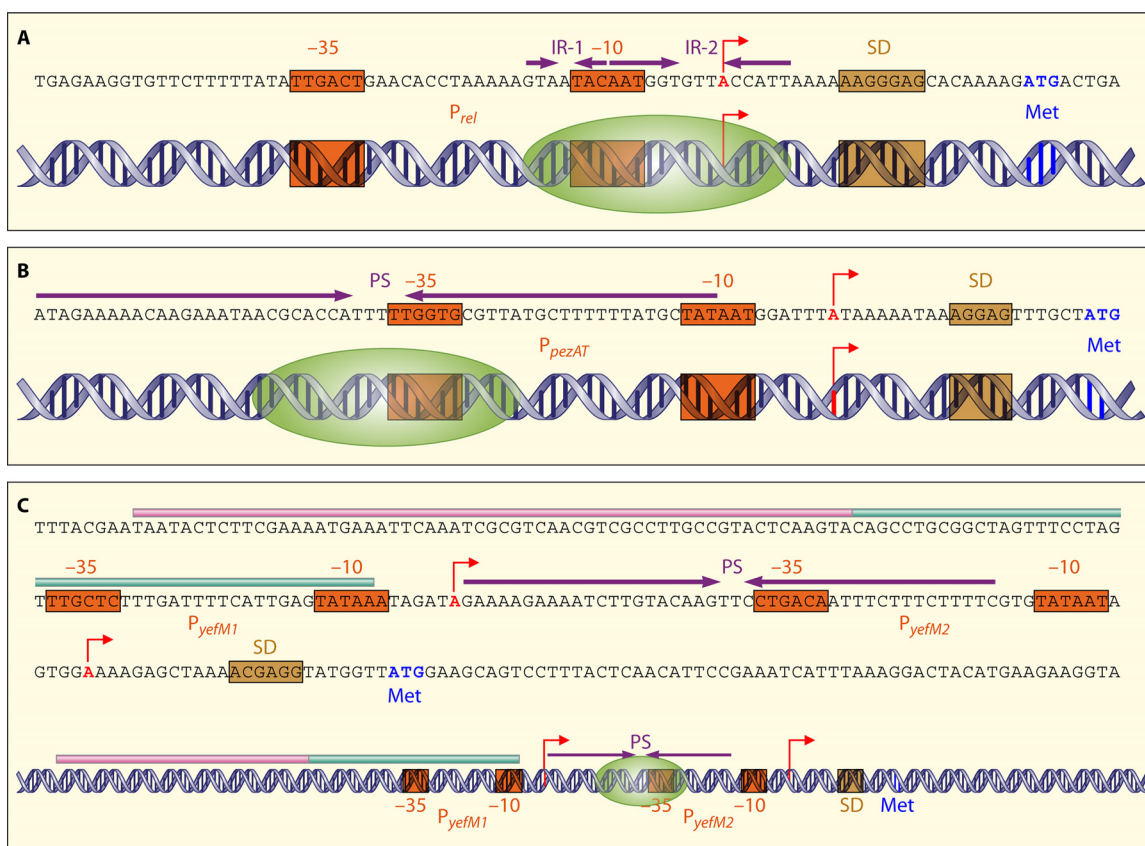


FIG 3 Schematic representation of the DNA double helix at the promoter regions of the pneumococcal *relBE2* (A), *pezAT* (B), and *yefM-yoeB* (C) TAS as well as the (putative) binding sites of their respective proteins. The inverted repeats (IR) or palindrome sequences (PS) are indicated by purple arrows, the transcriptional start sites are indicated by red arrows, and the boxA and boxC subelements are indicated by pink and green lines, respectively. The –10 and –35 promoter sequences (orange), the Shine-Dalgarno (SD) sequences (brown), as well as the start codon “Met” (navy blue) are also indicated. The proposed binding sites of the TA complexes (green ovals indicate the TA proteins) are also shown.

indrome sequence that overlaps the –35 sequence of the promoter *P_{yefM2}*, whereas the YoeB toxin serves as a corepressor to further repress transcription (21). The incorporation of the boxAC element upstream of *P_{yefM2}* created an additional promoter, designated *P_{yefM1}*, which is about 15-fold weaker than *P_{yefM2}* but not regulated by YefM and YoeB (Fig. 3C). Instead, transcriptional fusion assays indicated that the presence of boxAC (*P_{yefM1}*) together with *P_{yefM2}* and the *yefM* reading frame in *cis* led to transcriptional activation in *E. coli*. It was suggested that activation could be due to still unknown host binding factors and/or other *cis*-acting elements (21). The presence of this boxAC element is universal, as it is found in all sequenced pneumococcal strains that harbor an intact *yefM-yoeB* locus but is absent in other *yefM-yoeB* homologues of different bacteria. The conservation of the boxAC-*yefM-yoeB* arrangement in pneumococcal genomes indicated that the insertion of boxAC was not recent and is likely advantageous to its host. By increasing the overall basal transcription level of the *yefM-yoeB* locus, the boxAC element could possibly enable the pneumococcal cells to better adapt to and survive unfavorable conditions.

FUNCTIONALITY

The production of the pneumococcal RelE2 toxin in *E. coli* yielded a pattern similar to that of *E. coli* RelE, with cleavages at the

transfer-messenger RNA (tmRNA) stop and UUA codons, suggesting that the pneumococcal RelE2 toxin inhibits translation by mRNA cleavage (27). The transcription of the *relE2* gene was toxic to both *S. pneumoniae* and *E. coli*; the overproduction of RelE2 in the latter host resulted in cell growth arrest, which was rescued by the induction of the cognate *relB2* gene. However, the prolonged exposure of *E. coli* cells to the pneumococcal RelE2 toxin led to cells that were unable to form colonies, which is indicative of the antitoxin being effective only within a certain time frame (117). This contrasted with the response of *E. coli* cells to their cognate RelBE TAS, since in this case, cells could be rescued after antitoxin overproduction, even after long periods of exposure to the toxin (124). This phenomenon could reflect differences in the activities of the pneumococcal and the *E. coli* RelE toxins, but this hypothesis has not been investigated further.

The overproduction of the pneumococcal PezT toxin in *E. coli* resulted in growth inhibition for the first 3 h, but a restoration of cellular growth was observed subsequently, without the need for a concomitant synthesis of the PezA antitoxin (82). This growth profile is similar to the profile reported for *E. coli* cells overproducing the Zeta toxin (161). The toxicity of PezT was abolished with the coexpression of the *pezA* gene. In another study, the production of a truncated PezT protein (lacking the last 11 amino acids) after half an hour in *E. coli* yielded cells forming bulges

following membrane permeabilization and lysis, whereas the intact cells displayed small and ovoid morphologies (113). This toxicity is more severe in fast-dividing cells than in slow-growing or persister cells. *PezT/Zeta* was subsequently shown to inhibit bacterial cell wall synthesis by phosphorylating UDP-*N*-acetylglucosamine (UNAG) to UDP-*N*-acetylglucosamine-3'-phosphate (UNAG-3P) in the presence of ATP and Mg^{2+} . UNAG-3P inhibits MurA, the catalytic enzyme in the initial stage of peptidoglycan biosynthesis, and also competes with the synthesis of other glycoconjugates and subsequently provokes cell autolysis (113). UNAG is found in all kingdoms of life (42) and thus explains the toxicity of the *S. pyogenes*-encoded Zeta protein in eukaryotes such as *Saccharomyces cerevisiae* (162).

The overproduction of the pneumococcal YoeB toxin in *E. coli* led to the inhibition of cell growth and a reduction in the number of cells that were able to form colonies. The reductions were about 8 logarithmic units for the B strain (BL21) and 4 to 5 logarithmic units for the other two K-12 strains (MG1655 and TOP10) after 6 h of exposure to YoeB (116). On the other hand, the induction of the entire *yefM-yoeB* locus was nontoxic to the cells. The reduction in the number of cells that were able to form colonies following *yoeB* transcription could be alleviated by the later transcription of *yefM*: the numbers of CFU were reduced to 60% after 2 h and only 4% after 4 h of *yoeB* transcription, compared to 0.4% without YefM production, signifying that there is a window period for cell resuscitation (116). Moreover, the expression of *yoeB* in a Lon-deficient strain led to 85% of cells being able to form colonies after 1 h of *yoeB* overexpression, compared to only 25% of the colonies formed by the wild-type strain (116), indicating that Lon protease could play a role in YoeB-mediated toxicity. The target of pneumococcal YoeB has not been determined so far, but *E. coli* YoeB was shown to inhibit translation initiation by causing the cleavage of mRNAs at 3 bases downstream of the initiation codons *in vivo* (157). *E. coli* YoeB alone does not have RNase activity but is found to be associated with the 50S ribosomal subunit in 70S ribosomes and interacts with the ribosomal A site, leading to the cleavage of the mRNA (157). However, in another report, the *E. coli* YoeB toxin was shown to have *in vitro* RNase activity that preferentially cleaves at the 3' end of purine ribonucleotides (79). Besides overexpression assays, the pneumococcal *yefM-yoeB* TAS seemed to be able to increase the stability of a segregationally unstable mini-F replicon in *E. coli*, although no further results were sought (116).

STRUCTURAL INFORMATION

Analytical ultracentrifugation assays showed that the pneumococcal RelB2 antitoxin behaved as a dimer in solution, whereas the TA complex was, in its vast majority, a heterohexamer (105). This finding contrasted with the known structures of two RelBE protein complexes of archaeal origins, both of them being heterotetramers (53, 138). In the case of the *E. coli* RelBE complex, two possibilities have been reported: a heterotetramer (93) or a heterotrimer in solution (120). Further structural data might solve this apparent discrepancy. Circular dichroism experiments showed that the pneumococcal RelB antitoxin has a relatively high average number of secondary structures (around 35% of α -helices), which would increase after the formation of the RelBE protein complex, in agreement with previous results for the *E. coli* counterpart, so that both antitoxins would not be totally unfolded proteins (24, 105).

Concerning the predicted structure of the pneumococcal antitoxin RelB2, molecular modeling suggested that the N-terminal region of each monomer could fold during dimerization, with perhaps complete folding and dimerization being part of the same process. Thus, the dimer would have a ribbon-helix-helix (RHH) motif, by which it would bind to its target DNA, similar to the Arc-CopG-Omega family of transcriptional repressors (37, 62, 111, 121); in fact, the 28 N-terminal amino acids of the pneumococcal RelB protein share 64% similarity with the 45-residue CopG transcriptional repressor encoded by streptococcal plasmid pMV158 (37, 105). The RHH DNA-binding motif also seems to be present in the N-terminal regions of the RelB and YefM proteins from *E. coli* (79, 93, 119) and in the pneumococcal RelB2 protein (105) but not in the archaeal RelB proteins (53, 138) or in the pneumococcal YefM protein (our unpublished observations).

In the case of the *PezA* antitoxin, its C-terminal region shares homology to the C-terminal region of the plasmid-encoded Epsilon antitoxin. However, differences are found at their N-terminal moieties: *PezA* shows a helix-turn-helix (HTH) motif, which shares 30 to 40% sequence identity with the Xre and CI/Cro families of transcriptional repressors. This HTH motif is absent in the N-terminal moiety of the Epsilon antitoxin as well as in the Omega repressor of the *epsilon-zeta* TAS (82). In the case of Omega, this protein has an RHH motif (149) and belongs to the Arc-CopG family of proteins (62). The three-dimensional structures of the *PezT* toxin and the C terminus of *PezA* are similar to the structures of the Zeta toxin and Epsilon antitoxin, respectively. Mutations in equivalent residues of *PezT* that are involved in Zeta toxicity also abolished *PezT* toxicity (82). The similarities of the structures of Epsilon-Zeta and *PezA-PezT* are such that a degree of cross-reactivity has been observed between them: Epsilon was able to interact with *PezT* and could partly alleviate *PezT* toxicity, and conversely, the toxicity of Zeta could also be alleviated by *PezA* (C. C. Yeo and C. K. Lim, unpublished data). *PezT/Zeta* toxins have a characteristic Walker A motif for ATP/GTP binding along with a phosphoryltransferase active site. The antitoxins *PezA* and Epsilon function to negate the toxicity by occluding the ATP/GTP-binding site through tight binding with their respective toxins (82, 104). Nonetheless, toxin release is impeded in both *E. coli* and *B. subtilis* due to proteolytic resistance when both the *PezA* and *PezT* proteins are bound together (18, 94, 115), which was distinct from their Epsilon-Zeta homologues, in which a Lon- and ClpXP-dependent degradation of Epsilon occurred on a time scale of minutes in the presence of Zeta when the translation of this operon was inhibited in *B. subtilis*. The *PezAT* complex was also shown to have an increased thermodynamic stability and an enhanced electrostatic potential compared to both individual proteins. The femtomolar affinity of *PezA* and *PezT* is the strongest reported among all TAS, and even Epsilon-Zeta has only micromolar affinity (115).

Circular dichroism analyses showed that about 55% of the pneumococcal YefM antitoxin was unstructured at 4°C, but it did not have complete unfolding, even at elevated temperatures (116), which was in contrast to the results obtained for the *E. coli* YefM antitoxin (23). In the thermal stability assays, the melting temperature of the pneumococcal YefM antitoxin (about 45°C) was much lower than that of the pneumococcal YefM-YoeB complex (about 70°C), indicating that YefM may lack a significant hydrophobic core, a feature perhaps important to keep the antitoxin sensitive to proteolysis. Axe-Txe of *E. faecium* and the *E. coli*

encoded YefM-YoeB TAS could complement each other, but this was not the case for pneumococcal YefM-YoeB and *E. coli* YefM-YoeB (116). Based on molecular modeling, a positively charged moiety defined by an R72 residue in *E. coli* YefM, which is responsible for the interaction with the negatively charged pocket on the interface of *E. coli* YoeB, was observed for Axe but not pneumococcal YefM, thus implying the possible reason for the failure of pneumococcal YefM to neutralize the *E. coli* YoeB toxin. The pneumococcal YoeB structural model also showed a larger exposed surface than those of the *E. coli* YoeB and Txe toxins, which perhaps increases the potential interaction surface, leading to the ineffectiveness of *E. coli* YefM in counteracting the pneumococcal toxin (116).

TAS IN THE GENOME OF *S. PNEUMONIAE*: AND YET SO MANY

Bioinformatic searches for TAS in the sequenced *S. pneumoniae* genomes that are available in the NCBI database were performed. The search was based on data expanded from previous studies (99, 122, 136). The BLASTP program (cutoff point of 10^{-4}) was used to find homologues of the TAS families, namely, CcdAB, HicAB, HipBA, MazEF, PemIK, ParDE, Phd-Doc, RelBE, HigBA (also known as RelE-Xre [136]), YefM-YoeB, VapBC, MosAT, YeeUV, PezAT, Xre-COG2856, and Xre-Bro. Only complete TA pairs were included in this study, whereas solo toxins or solo antitoxins were excluded. A total of 352 TA pairs were found in 48 pneumococcal strains with completely sequenced genomes or contigs (from whole-genome shotgun sequences). The TBLASTN program (cutoff point of 10^{-4}) was then used to find homologues of the TA pairs that could have been missed due to the discrepancy of the annotation (Table 1). Indeed, we found another 17 additional TA pairs in all the genomes studied. Among the TAS that we searched, only HicAB, Phd-Doc, RelBE, HigBA, YefM-YoeB, PezAT, Xre-COG2856, and Xre-Bro were present in the genomes of *S. pneumoniae*. Others, like MazEF and VapBC, which are highly abundant in bacteria and archaea, were absent. The total number of TA pairs ranged from 4 to 10 in individual strains, with the average number of TA pairs being 7 (Table 1). These numbers could still be underestimated.

Of all these TAS, HicBA and functional RelBE2 were present in all the strains that were analyzed in this review, whereas Phd-Doc, RelBE1, and Xre-COG2856CA (see below) were present in nearly all the strains. The other two functionally characterized TAS, *pezAT* and *yefM-yoeB*, were also found in more than half of the strains. In certain strains, RelBE2 (7 out of 48 strains), PezAT (3 out of 31 strains), and Xre-COG2856B (3 out of 25 strains) (see below) were present as two copies (Table 1). Although the duplicates within a strain shared high percent similarities with each other (72% for RelE2, 96% for PezT, and 72% for COG2856B), their neighboring genes were very dissimilar and not clustered together. Interestingly, the second copy of RelBE2 is always associated with Xre-COG2856B (see below), and Bro2-Xre along with an integrase were also found in the neighboring sequences. We have chosen a few TAS that we think are interesting for further discussion and also as a wealth of information for future research: most of these pneumococcal TAS are putative, and no experimental information is available so far.

RelBE1 and RelBE2

As mentioned above, two different RelBE TAS exhibiting low levels of sequence similarity between them were found. The pneumococcal RelBE1 TAS was present in all the strains examined except GA04375. The putative RelE1 toxin was mostly conserved in all the strains except for strains SP19-BS75 and SP23-BS72, in which half of the *relE1* sequences were truncated. Sequence comparisons of the putative RelE1 pneumococcal toxin with *Pyrococcus horikoshii* RelE (79, 80, 118) showed that some amino acid residues that are likely involved in the toxic activity were absent in RelE1: two of the amino acid residues in *P. horikoshii* RelE (R65 and R85) that are responsible for the protein synthesis-inhibitory activity were not found in pneumococcal RelE1, but the other three important amino acid residues (R40, L48, and R58) of *P. horikoshii* RelE were conserved in pneumococcal RelE1 (corresponding to R43, L49, and R59). In the case of pneumococcal RelE2, all these five residues were conserved, which explained the endoribonuclease activity observed for RelE2 but not for RelE1. In spite of this, the presence of an intact *relBE1* locus in nearly all the pneumococcal strains examined is indicative to us that the functionality of this TAS has to be reassessed.

Conversely, RelBE2 has been proven as a bona fide TAS in *S. pneumoniae* and *E. coli* (117). We found that the *relBE2* locus is present in all the strains analyzed here, and in 7 out of 48 strains, two copies of the locus were found. When the gene organizations of *relBE2* in all the strains were carefully examined, we discovered that the strains that harbored the second copy of *relBE2* (Fig. 4E and F) had a different gene orientation than that of the first copy of *relBE2* (Fig. 4A to D). For the first copy of *relBE2* (which is present in all strains), four different groups of gene organizations were found, but in general, this *relBE2* operon was located downstream of the *vicX* gene (metal-dependent hydrolase), and the genes downstream of this operon were comprised of another kind of enigmatic pneumococcal repeat, the 107-nt-long repeat unit of pneumococcus or RUP unit (32), followed by *ldh* (lactate dehydrogenase) as well as *gyrA* (the A subunit of DNA gyrase) (Fig. 4). For group 1, genes encoding a putative type II restriction-modification system were found between *relE2* and the RUP unit (Fig. 4A); in group 2, the restriction-modification genes were replaced by a gene encoding a putative K^+ /cation channel protein (Fig. 4B). Group 3 showed a genetic structure similar to that of group 2 but with IS1167 inserted upstream of the *relBE2* operon (Fig. 4C). Group 4 is also similar to group 2 but with an IS1380-Spn1 insertion element inserted downstream of the gene encoding the putative K^+ /cation channel protein (Fig. 4D). On the other hand, for the second copy of the *relBE2* operon, the locus was flanked by another putative TAS, the *xre-COG2856B* genes (see below), and downstream of these two sets of TAS, a gene encoding a type I restriction endonuclease was found, followed by a transposase, and this organization was designated group 5. There are cases in which a stop codon was found within the COG2856B gene that separated this gene in two, but we still considered them to have a group 5 organization (Fig. 4E). Last but not least, in Group 6, which was similar to Group 5, the gene encoding the type I restriction endonuclease was replaced by an unknown gene (Fig. 4F). From the presence of insertion sequence (IS)-integrase and perhaps some phage-carried genes in neighboring sequences, we deduced that this second copy of the *relBE2* operon together with its neighboring genes were acquired foreign pieces of DNA. More-

TABLE 1 TA homologues in *S. pneumoniae* strains

<i>S. pneumoniae</i> strain	No. of TA homologues											Total
	HicBA	Phd-Doc	RelBE1	RelBE2	HigBA	YefM-YoeB	PezAT	Xre-COG2856CA	Xre-COG2856B	Xre-Bro1	Bro2-Xre	
AP200	1	1	1	1		1		1			1	7
70585	1	1	1	1			1	1	1		1	8
670-6B	1	1	1	1		1	1	1			1	8
ATCC 700669	1	1	1	2			2	1	2			10
BS397	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
BS455	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
BS457	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
BS458	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
CCRI 1974	1	1	1	1				1				5
CCRI 1974M2	1	1	1	1				1				5
CDC0288-04	1		1	1		1	1	1				6
CDC1087-00	1	1	1	1		1		1				6
CDC1873-00	1	1	1	2		1	1	1	1		1	10
CDC3059-06	1	1	1	2			1	1	2		1	10
CGSP14	1	1	1	1		1	2	1				8
D39	1		1	1		1	1	1				6
G54	1	1	1	1				1				5
GA04375	1	1		1				1				4
GA17545	1	1	1	1				1				5
GA17570	1	1	1	1		1	1		1			7
GA41301	1	1	1	2		1	1		1			9
GA41317	1		1	1		1		1	1		1	7
GA47368	1	1	1	2		1	1	1	1		1	10
GA47901	1	1	1	1				1				5
Hungary 19A-6	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	10
INV104	1	1	1	1		1		1				6
INV200	1	1	1	1		1	1	1				7
JJA	1	1	1	2		1	1		1			9
MLV-016	1	1	1	1		1		1				6
OXC141	1	1	1	1			1	1	1		1	8
P1031	1	1	1	2			2	1	1		1	10
R6	1		1	1		1	1	1				6
SP11-BS70	1	1	1	1		1		1	1		1	8
SP14-BS292	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
SP14-BS69	1	1	1	1			1	1	1		1	8
SP18-BS74	1	1	1	1				1		1		7
SP195	1	1	1	1		1	1		2		1	9
SP19-BS75	1	1	1	1		1	1	1				7
SP23-BS72	1		1	1		1	1	1				6
SP3-BS71	1	1	1	1			1	1	1		1	8
SP6-BS73	1	1	1	1			1	1	1			7
SP9-BS68	1	1	1	1		1	1		1			7
SP-BS293	1	1	1	1		1	1	1	1		1	9
Canada MDR_19A	1	1	1	1				1				5
Canada MDR_19F	1	1	1	1				1				5
Taiwan 19F-14	1	1	1	1				1				5
TCH8431/19A	1	1	1	1				1				5
TIGR4	1	1	1	1	1	1	1	1				8
Total	48	43	47	55	1	29	34	45	28	2	20	352

over, when the sequences of all these *relE2* homologues were compared, the sequences were highly conserved, but the first and second copies of *relE2* were distinct from each other (72% similarity). However, the five amino acid residues that were likely involved in the toxic activity were conserved in both copies of RelE2 in all the strains.

HigBA or RelE-Xre (136) also shares significant similarity with the pneumococcal RelBE family. The HigB putative toxin shares

44% similarity with RelE1 and 32% similarity with RelE2; whereas the HigA putative antitoxin shares 46% similarity with RelB1 and 38% similarity with RelB2. These percent similarities are high enough for us to propose it as a bona fide TA pair. However, the HigBA TA pair has a different gene organization from the RelBE family, in which the putative antitoxin *higA* is located downstream of the putative toxin *higB*. Nonetheless, this putative *higAB* locus was found in only one strain in this study, TIGR4.

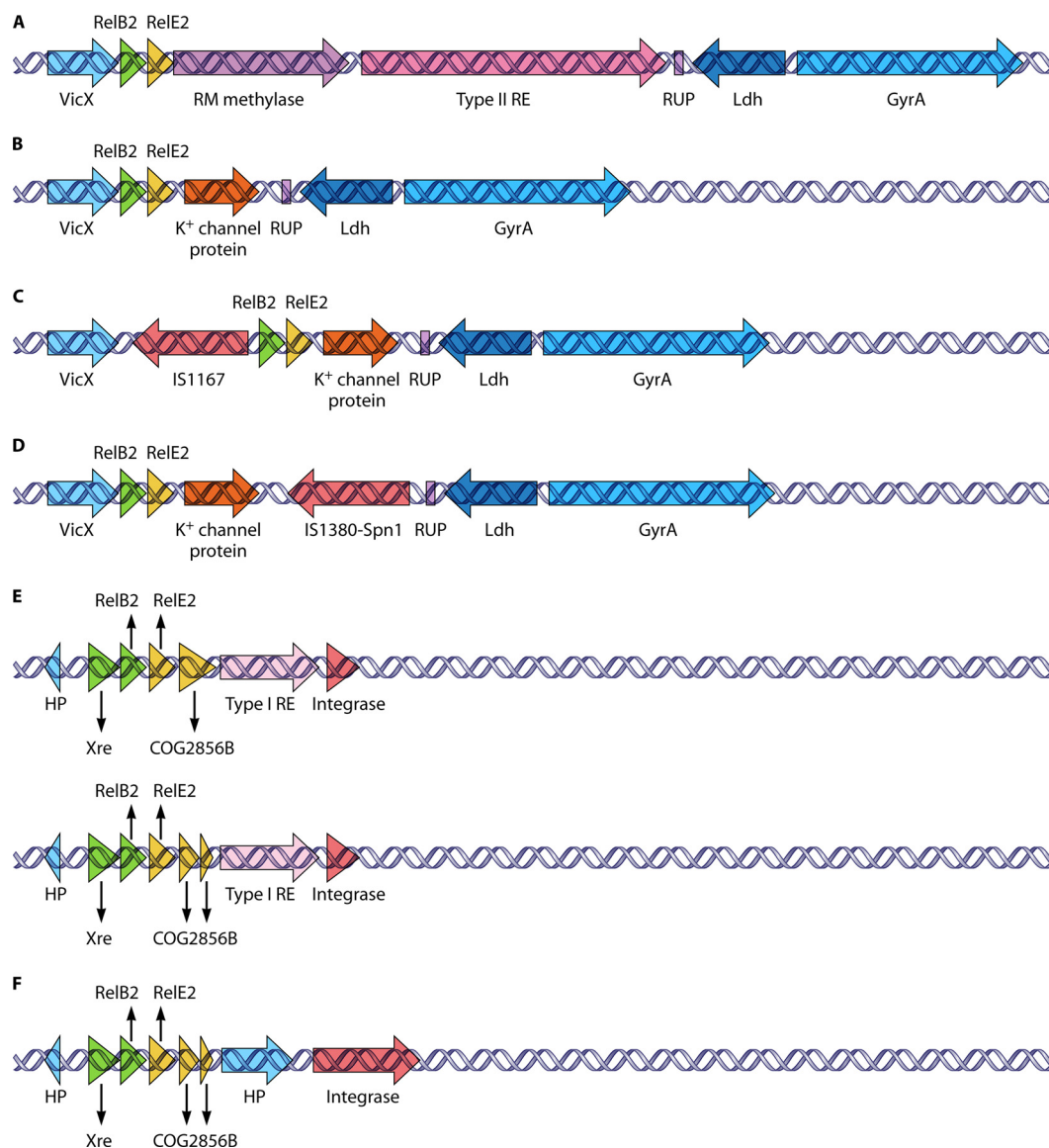


FIG 4 Polymorphisms associated with the genetic organization of *relBE2* and its neighboring genes found in *S. pneumoniae* clinical isolates (118) and NCBI databases. In general, the *relBE2* operon is flanked by *vicX* (metal-dependent hydrolase) at its upstream region, whereas a RUP (repeat unit of pneumococcus) element, *ldh* (lactate dehydrogenase), as well as *gyrA* (the A subunit of DNA gyrase) are located downstream. (A to D) Variations are found, as follows. (A) Genes that encode the putative restriction-modification (RM) methylase and type II restriction endonuclease (RE) are found immediately downstream of *relE2*; (B) a gene encoding a K⁺/cation channel protein is located immediately downstream of *relE2* instead; (C) same as in panel B but with a gene encoding an *IS1167* insertion sequence located immediately upstream of *relB2* in the opposite orientation; (D) same as panel B but with an *IS1380-Spn1* element found downstream of the gene encoding the K⁺/cation channel protein and in the opposite orientation while keeping the RUP element. (E and F) On the other hand, we found strains which harbor a second set of *relBE2* genes, which seems to be an acquired foreign DNA. They have totally different organization patterns from the types described above. (E) The *relBE2* genes are flanked by another putative set of TA genes, *xre*-COG2856B. Besides, an unknown hypothetical protein (HP) is found further upstream, and a type I restriction endonuclease and an integrase are found downstream of the COG2856B gene; in certain strains, a stop codon was found within COG2856B, which leads to the truncation of the gene. (F) Similar to panel E, but instead of a type I restriction endonuclease, an unknown hypothetical protein is found downstream of the COG2856B gene.

The Peculiar Xre-COG2856 TAS

COG2856 (Clusters of Orthologous Genes) belongs to the family of metzincin Zn-dependent proteases, and it was suggested to be a potential toxin (99, 137). The proteins of COG2856 are usually associated with the HTH domain-containing protein of the Xre family. The functions of these pneumococcal proteins are still unclear. After scrutinizing all the COG2856 protein sequences found in various strains of *S. pneumoniae* as suggested previously by Makarova et al. (99), we found that these proteins could be further

subdivided into three groups due to the low percent sequence similarities among each other. We thus propose to rename them COG2856A (GI 15903793 in the R6 genome), COG2856B (GI 169832735 in the Hungary 19A-6 genome), and COG2856C (GI 15903794 in the R6 genome). The percent similarities among them were 42% for COG2856A and COG2856B, 30% for COG2856A and COG2856C, and 26% for COG2856B and COG2856C. In all the strains that harbor COG2856A (i.e., 45 of 48 strains), COG2856C was located upstream of COG2856A (Fig.

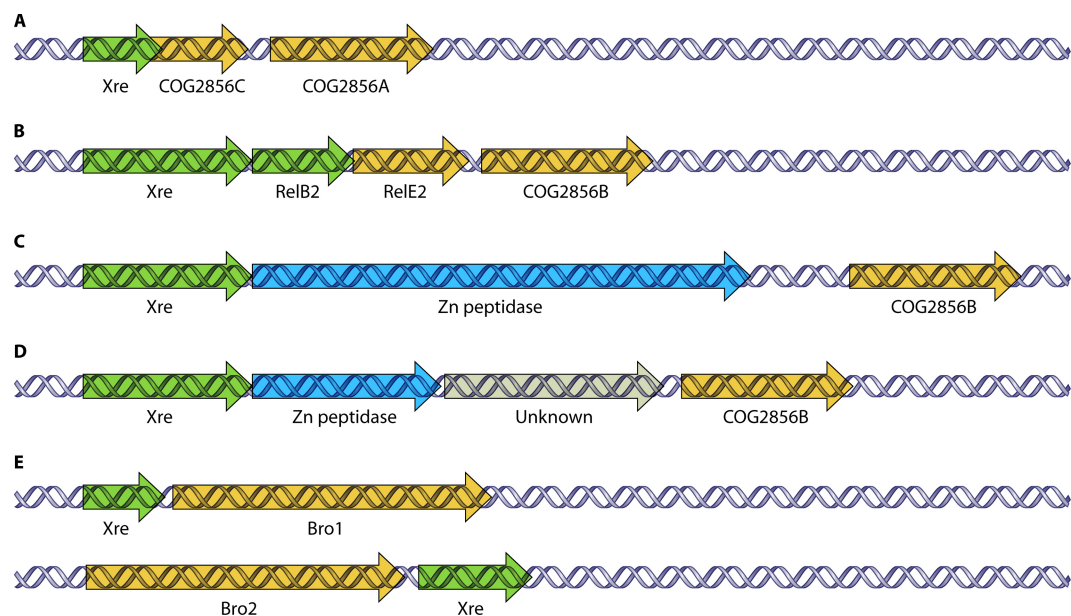


FIG 5 Genetic organization of novel putative pneumococcal TAS found in this study. (A) Three-component Xre-COG2856CA TAS. The gene for the COG2856C toxin is located upstream of the COG2856A toxin gene, with both toxins possibly sharing a common Xre antitoxin. The *xre* reading frame overlapped the upstream portion of the COG2856C reading frame. (B to D) For Xre-COG2856B, besides the typical gene organization in which the Xre antitoxin precedes the COG2856B toxin, *relBE2* (B), a Zn-peptidase (C), as well as a Zn-peptidase and an unknown gene (D) are found between Xre and COG2856B. (E) For the putative Xre-Bro TAS family, two contrasting gene organizations were evident: the *xre* antitoxin gene preceded the Bro1 toxin gene, whereas the Bro2 toxin gene preceded the *xre* antitoxin gene.

5A). In addition, both putative toxins share a putative antitoxin *xre* gene (which may also function as the transcriptional regulator of the system) that overlaps the 5' end of the gene of COG2856C. Thus, we renamed this putative TA Xre-COG2856CA. Although the sequences of these genes are conserved in general, the annotations vary among strains: the *xre* (~162 nt) and COG2856C (~207 nt) genes mostly overlap by 14 nt, whereas in strain R6, both genes overlap by 50 nt (Table 2). In general, most TA genes overlap by 1 nt (in which the stop codon of the antitoxin gene overlaps the start codon of the toxin gene) or 4 nt (122) so that both genes are cotranscribed, and the proteins are also coexpressed by translational coupling (45). However, there are also cases in which both TA genes are separated by 3 nt (like the pneumococcal *yefM-yoeB* genes) or overlap by 8 nt (like the pneumococcal *relBE2* genes). Hence, the annotation of the *xre* gene and the

gene of COG2856C as overlapping by 14 nt sounds plausible here. On the other hand, in most strains, the gene of COG2856C is either 72 nt or 50 nt apart from the gene of COG2856A (~333 nt). Besides, there is a strain (AP200) in which both genes were annotated as being separated by 157 nt (Table 2). The analysis of the sequences of the intergenic region led us to identify a possible promoter upstream of the gene of COG2856A. However, the distance between the putative SD sequence and the possible start codon TTG is 18 nt, which is perhaps a bit too far from the norm, and thus, if the gene of COG2856A is expressed, the translation could be less efficient. Interestingly, in strain SP6-BS73, there is a point mutation at the COG2856C stop codon TAA→CAA, which leads to the combination of both COG2856C and COG2856A as a single open reading frame (ORF) that could potentially encode a 298-amino-acid-residue protein. Having two toxin genes sharing an antitoxin counterpart is not common, as the antitoxin protein should be in excess of or at least equal to the toxin protein in order to neutralize the toxic effect of the toxin protein on cells under normal conditions. However, the stoichiometry of the TA complex could be 1 antitoxin to 2 toxins, as seen for *E. coli yefM-yoeB* (25), making it possible that the two toxin genes (COG2856C and COG2856A) would share the single *xre* antitoxin gene (Fig. 5A).

On the other hand, the Xre-COG2856B pair is less prevalent, since it is present in only 25 out of 48 strains, but it is present as two copies instead of one copy in strains ATCC 700669, CDC3059-06, and SP195 (Table 1). The Xre-COG2856B pair has diverse gene arrangements. First, in most of the strains, the putative *xre* antitoxin precedes COG2856B, and both genes are either 12 nt (14 out of 28 cases) or 21 nt (3 out of 28 cases) apart. Second, the *relBE2* genes are located between the *xre* and COG2856B genes in the same orientation, with *xre* overlapping *relB2* by 1 nt and *relB2* overlapping *relE2* by 1 nt, whereas *relE2* is 12 nt apart from

TABLE 2 Numbers of nucleotides in which the N-terminal-encoding portion of COG2856C overlaps with *xre* as well as the distance between COG2856C and COG2856A in various sequenced genomes of *S. pneumoniae*

No. of <i>S. pneumoniae</i> strains ^a	No. of overlapping nt of <i>xre</i> -COG2856C	Distance between COG2856C and COG2856A (nt)
12	14	72
5	14	50
1	50	50
1	14	157
1	14	Both genes combined
22	COG2856C is not annotated	
3	No annotation ^b	

^a Each strain harbors only one copy of the *xre*-COG2856AC genes.
^b Although no ORF is annotated, homologues of COG2856 were found in these sequences.

TABLE 3 Distance (number of nucleotides) between the N-terminal-encoding portion of Bro2 and *xre* in various sequenced genomes of *S. pneumoniae*

No. of <i>S. pneumoniae</i> strains ^a	No. of nt separating Bro2 from <i>xre</i>
8	11
7	12
3	13
2	No annotation ^b

^a Each strain harbors only one copy of the *xre*-Bro2 genes.

^b Although no ORF is annotated, homologues of *xre*-Bro were found in these sequences.

COG2856B (in 7 out of 28 cases) (Fig. 5B). This operon-like organization gives a hint that both TAS could be interrelated. Interactions between TAS were previously reported; e.g., the overexpression of the Doc toxin (from the Phd-Doc TAS) was shown to activate RelE-mediated mRNA cleavage in *E. coli* (56), but they do not belong to the same operon. However, the pneumococcal *xre-relB2-relE2*-COG2856B organization would be the first instance of two different TAS within a single operon. Third, a Zn²⁺-dependent peptidase-like protein appeared to be located between Xre and COG2856B (in 3 out of 28 cases) (Fig. 5C). Finally, a Zn²⁺ peptidase-like protein and an ORF of unknown function were located between Xre and COG2856B (in 1 out of 28 cases) (Fig. 5D). The diversity of the gene arrangements hints at the highly recombinogenic nature of this region of the pneumococcal genome. The functionality of these putative TAS, their link to the *relBE2* system, and their possible role(s) in *S. pneumoniae* biology are new and exciting avenues waiting to be explored.

The Paradoxical Xre-Bro TAS

Two relatively different Bro (baculovirus repeat ORF) sequences, renamed here Bro1 (GI 169833276 in the Hungary 19A-6 genome) and Bro2 (GI 169834001 in the Hungary 19A-6 genome) (34% similarity), as well as their respective putative antitoxin counterparts, which are Xre homologues, were found in a search of *S. pneumoniae* strains performed by Makarova et al. (99). Bro proteins are a family of DNA binding proteins encoding transcription regulators of DNA viruses that were also proposed to exist in bacterial TAS (74, 99). The Xre-Bro TAS is similar to phage repressor-antirepressor proteins that determine the state of the phage by regulating the expression of lytic genes (70, 99). The Ant (antirepressor) domains found in the C-terminal region of Bro1 were suggested to be toxic to bacteria (70, 99). Xre-Bro1 was pres-

ent in only two strains (Hungary 19A-6 and SP18-BS74), and its organization is that of a typical TAS, in which the putative *xre* antitoxin gene precedes the putative Bro1 toxin. Both genes are separated by 1 nt, indicating that both genes are likely cotranscribed and translationally coupled. Conversely, Bro2-Xre is present in 20 strains (Table 1), and strikingly, it has an orientation opposite that of its homologue Xre-Bro1, in which the putative Bro2 toxin is located upstream of the Xre antitoxin (Fig. 5E). Both the Bro2 and Xre genes are annotated to be between 11 and 13 nt apart (Table 3). Whether Xre-COG2856 and Xre-Bro are truly functional TAS awaits future investigations.

The Enigmatic BOX Elements

BOX elements are considered to be mobile sequences found exclusively in pneumococci and closely related species (102). They are distributed randomly and are numerous in intergenic regions in the genomes of strains TIGR4 (127 copies [109, 141]) and R6 (115 copies [72]). The BOX elements consist of three different modules: boxA (59 nt), boxB (45 nt), and boxC (50 nt) (102). BoxB is located between boxA and boxC and is present at between zero and eight copies. BOX elements which contain boxA and boxC modules have the potential to form a stable stem-loop structure, which could affect the expression levels of neighboring genes (84). The secondary structure seems to be more important than the base changes within the consensus sequence, as in certain cases, the BOX elements differ from the consensus, but the secondary structure remains the same (102). The BOX elements might enhance gene expression by either stabilizing mRNAs (e.g., increasing the half-life of the mRNA) or serving as DNA-binding sites for regulatory proteins (33, 84). They are also probably involved in the regulation of virulence, genetic competence (84), and phase variation (132).

The influence of the BOX subelement boxAC on the expression of the *yefM-yoeB* TAS of *S. pneumoniae* was reported recently by our laboratory (21); this boxAC is highly conserved in all the *S. pneumoniae* strains that harbor the *yefM-yoeB* TAS. In the strains that we studied here, BOX elements were annotated in only two instances, R6 and ATCC 700669. In strain R6, besides *yefM-yoeB*, a boxAC element was also detected 264 nt upstream of the putative *hicAB* TAS. However, there is an ORF encoding an unknown protein of 59 amino acid residues annotated 103 nt upstream of the *hicA* gene. The ORF overlaps the 3' portion of boxAC by 25 nt (Fig. 6A). Whether this unknown protein is translated and whether the boxAC element (no prominent promoter sequence

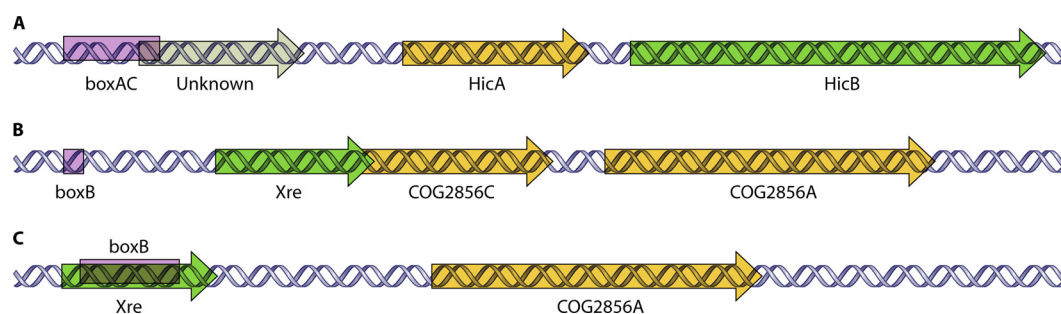


FIG 6 Putative pneumococcal TAS associated with BOX elements. (A) A boxAC element is found overlapping a gene upstream of *hicA* in the *hicAB* locus of strain R6. (B) A small boxB subelement was identified upstream of *xre* of the Xre-COG2856CA TAS in strain R6. (C) A different annotation in which a boxB subelement was found within the *xre* gene of the Xre-COG2856CA TAS (which has a similar sequence in strain R6) in strain ATCC 700669.

was observed) would affect the regulation of the *hicAB* TAS have yet to be determined. Nevertheless, a *boxB* subelement was also found to be associated with Xre-COG2856CA. In strain R6, a 21-nt *boxB* was located 138 nt upstream of Xre (Fig. 6B). However, a different annotation was assigned for strain ATCC 700669, whereby a 138-nt *boxB* was annotated within the Xre reading frame, and COG2856C was not annotated (Fig. 6C), even when both strains share similar sequences. Further research is needed to verify the discrepancy of these annotations.

DO PNEUMOCOCCAL TAS PLAY A ROLE IN THE BACTERIAL LIFE-STYLE?

The natural niche of *S. pneumoniae* is the mucosal surface of the upper respiratory tract in healthy individuals. Pneumococcal colonization of the upper respiratory tract seems to be asymptomatic but represents the environment in which *S. pneumoniae* exists most commonly and from which the bacteria spread to colonize new tissues (especially when the immune system is compromised) or new hosts. Thus, factors that contribute to bacterial persistence during colonization might increase its virulence (78). The triggering of TAS as a response to stress has been related to bacterial persistence, allowing the bacteria to survive under conditions of nutrient limitation (98). In this sense, chromosomal TAS may contribute to the survival of bacteria in their hosts, either as mediators of the so-called “altruistic” response to bacterial programmed cell death (44) or as modulators of bacterial cell growth that can lead to tolerance to antibiotics (118), perhaps under conditions that resemble the situation found in biofilms. In addition to the analyses described above, analyses of the genomes of 12 dangerous pandemic bacteria (including *S. pneumoniae*) showed that they possess not only a larger number of TAS than controls but also a smaller genome, implying that TAS could be preferably retained in pathogenic bacteria (57).

Interestingly, an in-depth analysis of the pneumococcal *relBE2* operon, which was performed for nearly 100 strains (70 from Spanish and Polish clinical isolates and 30 from genomes available in databases) showed that the operon was functionally present in all of them (118). In addition to several point mutations that did not seem to affect the functionality of the operon, several rearrangements were detected in the chromosomal region surrounding the *relBE2* operon, and these rearrangements were classified into three major groups, as shown in Fig. 4A to C (118). These three groups (118) have been enlarged here to up to six different arrangements (Fig. 4). Such a panoply of arrangements found in this region of the pneumococcal chromosome indicated that most of the clinical strains have been subjected to processes of accelerated evolution, probably due to the high selective pressure posed by the antibiotic treatments to which the patients were subjected. The advantage of keeping a functional *relBE2* cassette is presently unknown. Furthermore, the three earlier classes of polymorphisms corresponded well with the multiple-locus sequence types (MLST) rather than with the serotypes of the strains, making attractive the proposal that serotypes should not be the main criterion for pneumococcal typing but rather MLSTs (118). A similar proposal was recently made as a result of a large study (of 4,257 isolates) of *Salmonella enterica* (1).

The other two pneumococcal TAS, *pezAT* and *yoeB-yefM*, were not much conserved, and the former was found to be absent in several clinical isolates of *S. pneumoniae* (82). Intriguingly, the *pezAT* locus is located within pneumococcal pathogenicity island

1 (PPI1), and *PezT* had been linked with the virulence of *S. pneumoniae* when a mutant strain with a disruption in *pezT* showed significantly attenuated infection progression in mice but without any general growth defects compared to wild-type strains (17, 82). Furthermore, when *S. pneumoniae* serotype 1 isolates from native Australian patients were recently compared, the *pezAT* locus was found within the PPI-1v recombination hot spot in all hypervirulent isolates but was absent in noninvasive and intermediate-virulent strains (67). This finding is not surprising considering the high rate of recombination exhibited by *S. pneumoniae* (66), so rather, the unexpected finding was the conservation of the *relBE2* locus in many clinical isolates (118). *PezT* was postulated to contribute to pneumococcal virulence by triggering cell lysis, which is a requisite for the release of pneumolysin, one of the major pneumococcal virulence factors which causes host cellular damage and accelerates the progress of infection (115). Partial autolysis and the general inhibition of capsular polysaccharide synthesis by *PezT* would in turn favor the formation of biofilms. On the other hand, slowly dividing cells or persisters will survive the *PezT* release, and these cells will eventually recover by the production of *PezA* in the absence of stress conditions (115), which would in turn point to a behavior linked to bistability (see below). The postulated role of the *PezT* toxin in pneumococcal virulence was extensively discussed in a recent review (114).

Concerning the pneumococcal *yefM-yoeB* operon, preliminary data from our laboratory indicate that it might be involved in pneumococcal biofilm formation (I. Moreno-Córdoba, M. Moscoso, W. T. Chan, E. García, C. Nieto, and M. Espinosa, unpublished data), a role for TAS which was shown previously for *E. coli* (83). However, the presence of the BOX element upstream of the pneumococcal operon suggested to us that it might be involved in processes of bistability, although at present, it is only a matter of attractive speculation based on the ascribed role of the BOX element (see below). We further discuss below the various possible general roles of pneumococcal TAS in important aspects of the bacterial life-style, in particular persistence and bistable behavior.

Persistence

Bacterial persistence is the ability of individual cells to randomly enter a period of dormancy, during which the cells are protected against antibiotics and other harmful substances, so that they can survive harsh conditions and enhance their chances of survival (48). Bacterial persistence was discovered by Bigger in the 1940s, when he treated *S. aureus* cultures with a high concentration of penicillin and found that a small fraction of cells survived in the cultures (13). Dormancy is also a mechanism by which pathogens can escape the immune system of the host that they colonize, guaranteeing a successful invasion. The persisters constitute a small fraction of cells in an otherwise homogeneous population, and they play an important role in optimizing the decision-making process in bacterial populations (43). Persisters are genetically identical to the rest of the nontolerant cells, and they are able to exit dormancy by mechanisms not fully understood (47), perhaps by the stochastic appearance of “explorer cells,” which would check whether the environmental conditions are favorable (47). These explorers would determine whether the entire bacterial population should continue to be dormant (and the explorers would be killed) or the population can resume growth.

In *E. coli*, the deletion of 10 individual TAS encoding mRNases or the deletion of up to four of the TA loci did not significantly

affect bacterial persistence. However, the successive deletion of the 10 TA mRNases gradually reduced the formation of persisters (98). In addition, it was shown that the formation of persisters also depended on the Lon protease-mediated degradation of the antitoxins, whereby antitoxin degradation activated the mRNase activity of the toxin, leading to the inhibition of global translation and the induction of dormancy and persistence (98). On the other hand, the overproduction of the RelE (49, 81), HipA (49), or YgiT (135) toxin in *E. coli* increased the production of persister cells in response to different antibiotics, which coincided with recent findings by Maisonneuve et al. (98). However, it appears that the RelE toxin-mediated induction of persistence would take place under conditions of high cell density, which would resemble more the situation present in biofilms (140). It is worth noting that the overproduction of DnaJ in *E. coli* and PmrC in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, which are genes unrelated to TAS, also led to an increase in the number of persister cells (147). In fact, *E. coli* as well as other microbial pathogens have been shown to possess redundant pathways for the formation of persisters (92).

Persistence in G^- bacteria is better studied than in G^+ bacteria. Besides *S. aureus*, persistence was also reported to exist in streptococcal species such as *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, and *S. pneumoniae*. For pneumococci, it was reported that the *relBE2* locus was associated with antibiotic tolerance, because a mutation that abolished the synthesis of RelE2 led to cells that were more tolerant to treatment with antibiotics like erythromycin, although long-term persistence in biofilms was not analyzed (118). Nevertheless, a recent report showed that the overexpression of the RelBE and MazEF systems in *S. mutans* led to a 1-log-fold increase in the number of persister cells (91). However, that same study showed that a $\Delta mazEF \Delta relBE$ double deletion mutant did not exhibit any effect on persister formation, strongly indicating an apparent redundancy of persister genes in *S. mutans*, as had been found for *E. coli* and other bacteria. Indeed, a subsequent screening of an expression library led to the discovery of several other candidate persister genes, including some of those involved in transcription and replication, sugar and energy metabolism, and cell wall synthesis (91). Interestingly, that same study also showed that an intraspecies *S. mutans* quorum-sensing system, the competence-stimulating peptide (CSP)-ComDE regulatory circuit, was directly involved in persister development (91).

The modes of action of the TAS may provide a clue as to how the persisters are formed, such as TA-encoding mRNases reducing the global translation levels or PezT inhibiting cell wall synthesis. However, the determination of which cell is the fortunate one that could escape from the adverse condition and survive as a persister still remains puzzling, or perhaps it is due merely to stochasticity, as was found for *E. coli* persistence mediated by *hipBA* (130). It is interesting that the decision to follow a vegetative life or to sporulate in the G^+ bacterium *B. subtilis* seems to be determined by a “molecular race” between differentiation programs competing with each other in time and not by complex cross-regulatory mechanisms (88). Nonetheless, we can postulate that persistence, just like sporulation, is likely a bistable process that constitutes a smart yet optimal strategy to survive environmental changes for the benefit of the bacterium as a whole and that TAS may play an important role in this benefit (see below).

Bistability

In certain circumstances, such as stressful conditions, a population of genetically identical bacteria that grow under nearly homogeneous conditions will separate stochastically into two or more distinct subpopulations, a phenomenon termed bi- or multistability, respectively (75). The bistable behavior would represent the possibility of switching between two semistable states, coexisting simultaneously in the same population and environment and in which the possession of a panoply of regulatory feedback (positive or negative) loops would be beneficial for the population as a whole (128). Bistability has been observed for a number of bacterial processes, such as the formation of persisters (see above), genetic competence, escape from sporulation, and biofilm formation (29, 30, 41). A mixture of cells expressing different sets of genes within a population coexisting in the same environment could improve the chances of survival of part of the population, so that stochastic switching could be the best strategy for optimal survival, i.e., a bet-hedging strategy. Although population heterogeneity can incur a fitness cost, since part of the population would always be maladaptive in a given environment, theoretical studies indicated that under conditions of environmental fluctuations, stochastic switching led to a net fitness gain for the population (54, 142).

Reports of bistable processes in *S. pneumoniae* and closely related bacteria include at least phase variation (132), persistence (91), competence (30, 41), and the expression of type I pilus genes (11), with most of the repertoire of genes participating in these processes also being involved in virulence. An interesting example was provided by a global analysis of transcription during the onset of competence in pneumococci. It showed the transcriptional activation of two choline-binding proteins, and a functional role of one of them in competence was demonstrated (129). Furthermore, autolysis and competence have been shown for *S. pneumoniae* (30), and a suggestion that at least one of these choline-binding proteins could play a role in autolysis or in changes in the cell wall during competence was made (129). These findings, obtained well before the role of PezAT in cell wall integrity was demonstrated (113), could be used by us to argue in favor of a connection between competence and this specific TA, all within a bistable behavior.

The discovery of a BOX element associated with *yefM-yoeB* and the putative *hicAB* and *xre-COG2856CA* TAS in *S. pneumoniae* raised the question of whether these TAS have any other role that is related to other cell processes. There have been reports showing that most BOX elements are located in the immediate vicinity of genes that are related to competence in the genome of *S. pneumoniae*, such as the *comA*, *hexB*, and, possibly, *mmsA* genes (22, 102). Besides competence, BOX elements are also found close to genes such as *neuA*, which encodes the pneumococcal virulence factor neuraminidase (19), and *ply*, which encodes another virulence factor, termed pneumolysin (148). The location of these BOX elements in the immediate vicinity of genes related to competence and virulence raises the intriguing possibility of BOX elements being involved in coordinating the expression and modulation of these genes, perhaps being dependent on the copy numbers of the boxB subelement and its orientation, as suggested by Knutsen et al. (84). It is worth noting that competence and virulence (both likely bistable) are also viewed as global responses of *S. pneumoniae* upon stress, just like the activation of TAS. In

another report, it was shown that a BOX element, although not necessary for the expression of opacity, increased the frequency of (bistable) phase variation and made the observation of opaque variants more likely (132). It would thus appear that the hyper-recombinogenic nature of *S. pneumoniae* provides the bacterium with selective advantages when subjected to stressful conditions, such as the incorporation of an integrative piece, like the BOX element, into an operative genome piece, such as the *comA*, *neuA*, and *ply* genes and the *yefM-yoeB* operon (8, 9). This “molecular attunement” of the cells to their changing environment may have led to a better fitness of the bacteria, although strains totally devoid of all BOX elements have not been constructed so far (32). Interestingly, a recent *in silico* evolutionary simulation showed that in fluctuating environments, the emergence and maintenance of bistability occur only in the presence of noise, and the emergence of bistability enables a faster adaptation to the fluctuating environment (89). Selective forces that lead to higher/lower noise might also enhance/inhibit the evolution of bistability and non-linearity in gene regulation (89). The conservation of BOX elements in pneumococcal genomes is indicative of their utility to the bacterial cell. The integration of the BOX element upstream of the *yefM-yoeB* locus led to the creation of an additional promoter that was not regulated by either YefM or the YefM-YoeB complex (21). It could thus be hypothesized that the additional promoter afforded by the BOX element enabled higher noise in the expression of *yefM-yoeB*, thereby enhancing its bistable behavior and enabling a faster adaptation to changing environments. Whether BOX elements play similar roles in other pneumococcal genes with which they are associated awaits experimental validation.

How would *S. pneumoniae* benefit from the genetic inducement brought about by the acquisition of the, at least, three TAS that we have analyzed here? Any events that could disrupt the interaction of the TA complex would release the toxin to exert its lethal effect. This may affect a subpopulation (bistable) of bacteria in which a cell death program would be triggered after an environmental stress (46, 85). Stressful conditions that trigger the RelBE TAS could lead to the RelE-mediated cell death of a part of the population, whereas the other part will cease growing (118), which in turn may lead to the development of persisters (Fig. 7A). In the case of *yefM-yoeB*, the presence of BOX may prompt pneumococci to processes that could belong to an evolutionary schedule, where a fraction of the population starts a program that can lead to entry into a genetic competence state for transformation (30) (Fig. 7B). In both cases, we have preliminary evidence that the deletion of either *yefM-yoeB* or *relBE* results in a slight, but significant, decrease in the frequency of transformation, which, in addition, was cumulative in a mutant deleted in both systems (Moreno-Córdoba et al., unpublished). In the case of PezAT, it was shown that the activation of the PezT toxin led to cell lysis (113). In this situation (Fig. 7C), part of the population will survive, while lysis would lead to the release of DNA, which would be used by other competent bacteria: the killing of sister cells (fratricide) is common in *S. pneumoniae* (29). Thus, the triggering of one or all of the toxins would result in different bistable (or even, perhaps, multi-stable) situations, which would lead to persister development and in turn would facilitate biofilm formation (Fig. 7), and we have preliminary evidence that deletions of the *relBE* and *yefM-yoeB* operons lead to a substantial reduction in the ability of the cells to generate biofilms (Moreno-Córdoba et al., unpublished).

All in all, we propose that the triggering of TAS leads *S. pneu-*

moniae to a situation in which evolutionary processes would be at work and leads to situations which might prompt bacteria to competence and persister development. These processes, as well as those reported to occur when *B. subtilis* cells escape from the sporulation developmental program (63), are mediated by the killing of part of the sister cells through cannibalism (*B. subtilis*) or fratricide (*S. pneumoniae*) and belong to a bistable variation within a bacterial population (41). However, the mechanisms leading to their response (altruism, persistence, cannibalism, or fratricide) might not be related to but rather pertain to global evolutionary processes. Indeed, it was proposed previously that a general response to stressful conditions triggers several regulons involved in genetic competence (30). The presence of BOX elements upstream of genes involved in pneumococcal competence (84) and the presence of the boxAC element upstream of the *yefM-yoeB* operon (21) make it tempting to speculate that the responses to stress mediated by at least the three specific TAS belong to a bistable variation and that the BOX elements play a role in enhancing the evolution of bistability in these systems and, thus, the adaptability of the bacteria to fluctuating environments.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES: USE OF TAS AS ANTIMICROBIALS

In the pathogenesis of disease and survival inside the host, bacteria are subjected to stress. A promising global solution to the potential lack of anti-infectives against pneumococci could be to unbalance the regulated synthesis of macromolecules. This could provide a target for anti-infective interventions that would assist existing therapy and the natural defenses of the host. One possibility would be to use the toxin of a given TA pair as a bactericidal or bacteriostatic compound. To achieve this, compounds that could disrupt the interactions between a toxin and its cognate antitoxin could be very useful as antibacterials: an unbalanced synthesis of each independent TAS triggers cell growth arrest or, for prolonged periods of time, cell death, with a survival rate of 1×10^{-6} to 10^{-7} per each TA pair (127). Thus, it is conceivable that the employment of two independent toxins would potentiate such cell death, and indeed, TAS have been used in the design of tools for the biological containment of strains designed for bioremediation and other industrial purposes (87, 123, 127).

However, even if this approach is feasible, its usefulness might be hampered by the finding that a disruption of the interaction between PezA and PezT, to activate PezT for potential antimicrobial therapy, would be difficult because of the strong binding of PezA and PezT (114). To monitor the possibility of such a disruption, several approaches were proposed (4), and specifically, one of them, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) (153), was shown to be effective for the detection of interactions between the pneumococcal RelB antitoxin and RelE toxin *in vivo* (117). The adaptation of BRET assays to high-throughput formats allowed the screening of peptide libraries (nearly 50 million individual peptides), and two peptide mixtures were shown to inhibit, albeit slightly, the interactions between the Epsilon antitoxin and the Zeta toxin, opening interesting possibilities for the development of novel antibacterial compounds (95). The use of the artificial activation of the toxins of TAS as an antibacterial strategy was recently reviewed (150).

A most exciting approach has been made by the finding that small synthetic peptides derived from the ParE toxin from *E. coli* (included as a member of the RelE toxin superfamily) as well as

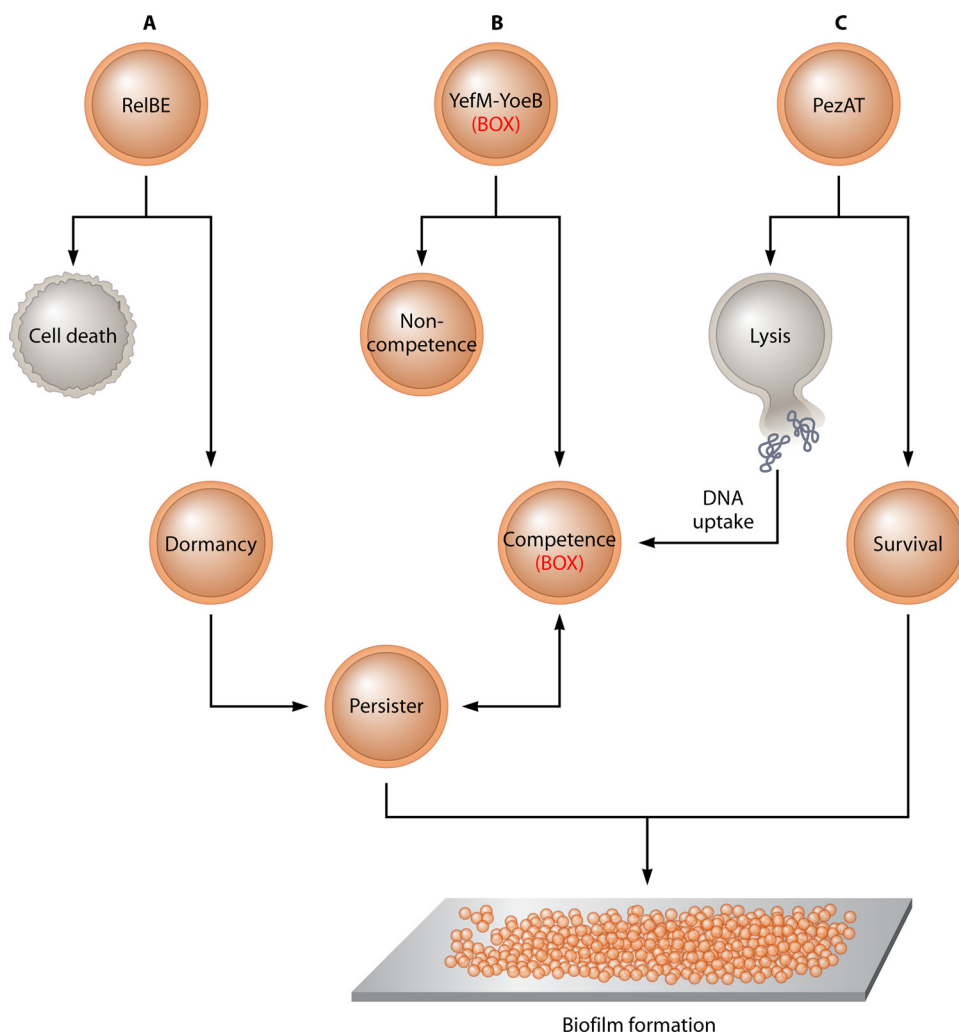


FIG 7 Model of the possible bistable behavior of *S. pneumoniae* cells subjected to stress. (A) Antibiotic stress may lead to RelE2-mediated cell death for part of the population, but part of the cells would undergo dormancy instead (i.e., persister cells) and are thus tolerant toward the antibiotics. (B) Preliminary results indicate that the deletion of the *yefM-yoeB* TA locus led to decreased competence in *S. pneumoniae* (Moreno-Córdoba et al., unpublished). Under stressful conditions, a fraction of cells would undergo a genetic competent state, whereas the rest would remain noncompetent. *yefM-yoeB* and some genes involved in competence were related to the pneumococcal BOX element, raising speculation on the role of BOX. (C) PezT was demonstrated to be involved in cell lysis under harsh environmental conditions, thus releasing DNA that could be taken up by the competent sibling cells, whereas the cells that survive, which also include persister cells, could in turn facilitate biofilm formation. All these processes would result in *S. pneumoniae* cells displaying bistable behavior under conditions of stress that perhaps involve, directly or indirectly, the three known pneumococcal TAS.

peptides derived from the CcdB toxin were able to inhibit topoisomerases (from bacteria to humans) *in vitro*, a discovery which no doubt will open new uses for the toxicity of the toxins (10, 144). Whether this approach can be used to design small RNAs that encode the desired peptides and, if so, whether they can be used as potential antibacterials remain to be seen.

The acquisition of antibiotic resistances by pathogens is only a matter of time due to genetic evolvability and horizontal gene transfer, which consequently establish a diverse pool of resistance and related genes, the resistome. The discovery of novel alternatives that can extend the capabilities of therapy is critical, because a number of processes are at work: horizontal gene transfer, serotype replacements in populations subjected to pneumococcal vaccination, and the selection of antibiotic-resistant strains due to the indiscriminant use of these antimicrobials, to name a few. Findings like those discussed here, and the possibility of a stimulation

of TAS synthesis as means of developing antimicrobials (150), open new avenues to explore the exploitation of the potential toxic activity of the pneumococcal toxins as a means to develop novel anti-infectives. Although there is a long way to go before effective drugs can be derived from these toxins, there is still a wealth of unexplored possibilities in pneumococcal genomes: novel genetic organizations, duplications of TAS in pairs, and the solving of enigmas like the (possible) role of BOX elements and the novel genetic organization of TAS in pneumococcal genomes will be matters for future experimentation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kenn Gerdes, the two anonymous reviewers, and members of the INTERMODS Consortium for critical reading and suggestions on the manuscript; present and former members of the Espinosa laboratory; and numerous colleagues from the Spanish Network of Extrachromosomal

Elements (REDEEX) for many fruitful discussions. C.C.Y. thanks A. Meinhart, J. A. Harikrishna, and past members of his laboratory for the productive work and discussions as well as the camaraderie.

While this review was written, our laboratories were supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grants CSD-2008-00013, INTERMODS, and BFU2010-19597 to M.E.), the European Union (grant EU-CP223111, CAREPNEUMO, to M.E.), and the Malaysian Ministry of Science, Technology and Innovation (grants 09-99-06-0104-EA001, 02-02-05-SF0019, and 02-02-05-SF0026 and SAGA grant M18 to C.C.Y.).

REFERENCES

- Achtman M, et al. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog. 8:e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776.
- Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. 1996. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6059–6063.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128:1037–1050.
- Alonso JC, et al. 2007. Bacterial toxin-antitoxin systems as targets for the development of novel antibiotics, p 313–329. In Bonomo RA, Tolmasek ME (ed), Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press, Washington, DC.
- Anderson DI. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 6:452–456.
- Anderson MT, Seifert HS. 2011. Opportunity and means: horizontal gene transfer from the human host to a bacterial pathogen. mBio 2(1): e00005–11. doi:10.1128/mBio.00005-11.
- Arkin MR, Wells JA. 2004. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. Nat. Rev. Drug Discov. 3:301–317.
- Baquero F. 2009. Environmental stress and evolvability in microbial systems. Clin. Microbiol. Infect. 15:5–10.
- Baquero F. 2004. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 2:510–518.
- Barbosa LCB, et al. 2012. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. Eur. J. Med. Chem. 54: 591–596.
- Basset A, et al. 2012. An epigenetic switch mediates bistable expression of the type 1 pilus genes in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 194: 1088–1091.
- Bernard P, Couturier M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J. Mol. Biol. 226:735–745.
- Bigger JW. 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. Lancet 244:497–500.
- Bogaert D, et al. 2004. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. Lancet 363:1871–1872.
- Bravo A, de Torrontegui G, Díaz R. 1987. Identification of components of a new stability system of plasmid R1, Par D, that is close to the origin of replication of this plasmid. Mol. Gen. Genet. 210:101–110.
- Bravo A, Ortega S, de Torrontegui G, Díaz R. 1988. Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1. Mol. Gen. Genet. 215:146–151.
- Brown JS, Gilliland SM, Spratt BG, Holden DW. 2004. A locus contained within a variable region of pneumococcal pathogenicity island 1 contributes to virulence in mice. Infect. Immun. 72:1587–1593.
- Camacho AG, et al. 2002. *In vitro* and *in vivo* stability of the epsilon2zeta2 protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system. Biol. Chem. 383:1701–1713.
- Camara M, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ. 1991. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 59:2856–2858.
- Ceglowski P, Boitsov A, Chai S, Alonso JC. 1993. Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. Gene 136:1–12.
- Chan WT, et al. 2011. Genetic regulation of the yefM-yoeB_{Spn} toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 193:4612–4625.
- Chandler MS, Morrison DA. 1988. Identification of two proteins encoded by com, a competence control locus of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 170:3136–3141.
- Cherny I, Gazit E. 2004. The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target. J. Biol. Chem. 279:8252–8261.
- Cherny I, et al. 2007. Structural and thermodynamic characterization of the *Escherichia coli* RelBE toxin-antitoxin system: indication for a functional role of differential stability. Biochemistry 46:12152–12163.
- Cherny I, Rockah L, Gazit E. 2005. The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin. J. Biol. Chem. 280:30063–30072.
- Christensen SK, Gerdes K. 2003. RelE toxins from bacteria and archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. Mol. Microbiol. 48:1389–1400.
- Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K. 2003. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. J. Mol. Biol. 332:809–819.
- Christensen-Dalsgaard M, Jørgensen MG, Gerdes K. 2010. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. Mol. Microbiol. 75:333–348.
- Claverys JP, Havarstein LS. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and reasons d'être. Nat. Rev. Microbiol. 5:219–229.
- Claverys JP, Prudhomme M, Martin B. 2006. Induction of competence regulons as general stress responses in Gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 60:451–475.
- Critchlow SE, et al. 1997. The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. J. Mol. Biol. 273:826–839.
- Croucher NJ, Vernikos GS, Parkhill J, Bentley SD. 2011. Identification, variation and transcription of pneumococcal repeat sequences. BMC Genomics 12:120. doi:10.1186/1471-2164-12-120.
- Croucher NJ, et al. 2009. Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. J. Bacteriol. 191:1480–1489.
- Dao-Thi MH, et al. 2005. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. J. Mol. Biol. 348:1091–1102.
- de la Hoz AB, et al. 2000. Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:728–733.
- de la Hoz AB, et al. 2004. Recognition of DNA by Omega protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035: analysis of binding to operator DNA with one to four heptad repeats. Nucleic Acids Res. 32:3136–3147.
- del Solar G, Hernández-Arriaga AM, Gomis-Rüth FX, Coll M, Espinosa M. 2002. A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors in control of plasmid copy number. J. Bacteriol. 184:4943–4951.
- Diago-Navarro E, et al. 2010. parD toxin-antitoxin system of plasmid R1—basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin-antitoxin systems. FEBS J. 277:3097–3117.
- Díaz-Orejas R, et al. 2010. Bacterial toxin-antitoxin systems targeting translation. J. Appl. Biomed. 8:179–188.
- Donegan NP, Cheung AL. 2009. Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on sigB expression. J. Bacteriol. 191:2795–2805.
- Dubnau D, Losick R. 2006. Bistability in bacteria. Mol. Microbiol. 61:564–572.
- Durand P, Golinelli-Pimpaneau B, Mouilleron S, Badet B, Badet-Denisot MA. 2008. Highlights of glucosamine-6P synthase catalysis. Arch. Biochem. Biophys. 474:302–317.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. Science 297:1183–1186.
- Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R. 2006. Bacterially programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. PLoS Genet. 2:e135. doi:10.1371/journal.pgen.0020135.
- Engelberg-Kulka H, Glaser G. 1999. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiol. 53:43–70.
- Engelberg-Kulka H, Hazan R. 2003. Cannibals defy starvation and avoid sporulation. Science 301:467–468.

47. Epstein SS. 2009. Microbial awakenings. *Nature* 457:1083. doi:10.1038/4571083a.
48. Evdokimov A, et al. 2009. New kinase regulation mechanism found in HipBA: a bacterial persistence switch. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65:875–879.
49. Falla TJ, Chopra I. 1998. Joint tolerance to beta-lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of *hipA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3282–3284.
50. Fernandez-Lopez R, et al. 2005. Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology* 151:3517–3526.
51. Fineran PC, et al. 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:894–899.
52. Fojo EM, Hemm MR, Storz G. 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:579–589.
53. Francuski D, Saenger W. 2009. Crystal structure of the antitoxin-toxin protein complex RelB-RelE from *Methanococcus jannaschii*. *J. Mol. Biol.* 393:898–908.
54. Gaál B, Pitchford JW, Wood AJ. 2010. Exact results for the evolution of stochastic switching in variable asymmetric environments. *Genetics* 184:1113–1119.
55. Gamez G, Hammerschmidt S. 2012. Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Curr. Drug Targets* 13:323–337.
56. Garcia-Pino A, et al. 2008. Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J. Biol. Chem.* 283:30821–30827.
57. Georgiades K, Raoult D. 2011. Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS One* 6:e17962. doi:10.1371/journal.pone.0017962.
58. Gerdes K, Christensen KS, Lobner-Olesen A. 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:371–382.
59. Gerdes K, Gulyaev AP, Franch T, Pedersen K, Mikkelsen ND. 1997. Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* 31:1–31.
60. Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. 1986. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:3116–3120.
61. Gerdes K, Wagner EG. 2007. RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:117–124.
62. Gomis-Ruth FX, et al. 1998. The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.* 17:7404–7415.
63. González-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301:510–513.
64. Gotfredsen M, Gerdes K. 1998. The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* 29:1065–1076.
65. Grady R, Hayes F. 2003. Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* 47:1419–1432.
66. Hanage WP, Fraser C, Tang J, Connor TR, Corander J. 2009. Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science* 324:1454–1457.
67. Harvey RM, et al. 2011. A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. *PLoS One* 6:e19650. doi:10.1371/journal.pone.0019650.
68. Hayes F. 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301:1496–1499.
69. Hayes F, Van Melder L. 2011. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46:386–408.
70. Heinrich J, Velleman M, Schuster H. 1995. The tripartite immunity system of phages P1 and P7. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:121–126.
71. Hernandez-Rocamora VM, et al. 2009. Multivalent choline dendrimers as potent inhibitors of pneumococcal cell-wall hydrolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48:948–951.
72. Hoskins J, et al. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183:5709–5717.
73. Huang F, He Z-G. 2010. Characterization of an interplay between a *Mycobacterium tuberculosis* MazF homolog, Rv1495 and its sole DNA topoisomerase I. *Nucleic Acids Res.* 38:8219–8230.
74. Iyer LM, Koonin EV, Aravind L. 2002. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0012. doi:10.1186/gb-2002-3-3-research0012.
75. Jayaraman R. 2008. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J. Biosci.* 33:795–805.
76. Jones RN. 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest* 119(2 Suppl):397S–404S. doi: 10.1038/msb.2011.98.
77. Jørgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. 2009. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 191:1191–1199.
78. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:288–301.
79. Kamada K, Hanaoka F. 2005. Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* 19:497–509.
80. Kamada K, Hanaoka F, Burley SK. 2003. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* 11:875–884.
81. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:8172–8180.
82. Khoo SK, et al. 2007. Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 282:19606–19618.
83. Kim Y, Wang X, Ma Q, Zhang XS, Wood TK. 2009. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J. Bacteriol.* 191:1258–1267.
84. Knutsen E, Johnsborg O, Quentin Y, Claverys JP, Havarstein LS. 2006. BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development. *J. Bacteriol.* 188:8307–8312.
85. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H. 2007. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318:652–655.
86. Korch SB, Hill TM. 2006. Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J. Bacteriol.* 188:3826–3836.
87. Kristoffersen P, Jensen GB, Gerdes K, Piškur J. 2000. Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5524–5526.
88. Kuchina A, et al. 2011. Temporal competition between differentiation programs determines cell fate choice. *Mol. Syst. Biol.* 7:557. doi:10.1038/msb.2011.88.
89. Kuwahara H, Soyer OS. 2012. Bistability in feedback circuits as a by-product of evolution of evolvability. *Mol. Syst. Biol.* 8:564. doi:10.1038/msb.2011.98.
90. Leplae R, et al. 2011. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 39:5513–5525.
91. Leung V, Lévesque CM. 2012. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *J. Bacteriol.* 194:2265–2274.
92. Lewis K. 2010. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:357–372.
93. Li G-Y, Zhang Y, Inouye M, Ikura M. 2008. Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *J. Mol. Biol.* 380:107–119.
94. Liou VS, et al. 2006. pSM19035-encoded zeta toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiology* 152:2365–2379.
95. Liou VS, Rey O, Balsa D, Pellicer T, Alonso JC. 2010. A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* 63:31–39.
96. Liu M, Zhang Y, Inouye M, Woychik NA. 2008. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:5885–5890.
97. López-Villarejo J, Diago-Navarro E, Hernández-Arriaga AM, Díaz-Orejón R. 2012. Kis antitoxin couples plasmid R1 replication and *parD* (*kis*, *kid*) maintenance modules. *Plasmid* 67:118–127.
98. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:13206–13211.
99. Makarova K, Wolf YI, Koonin EV. 2009. Comprehensive comparative-

- genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol. Direct* 4:19. doi:10.1186/1745-6150-4-19.
100. Mandell LA, et al. 2007. Infectious Diseases Society of America/ American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 44:S27–72.
 101. Marra A. 2004. Can virulence factors be viable antibacterial targets? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2:61–72.
 102. Martin B, et al. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479–3483.
 103. Masuda Y, Miyakawa K, Nishimura Y, Ohtsubo E. 1993. *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J. Bacteriol.* 175:6850–6856.
 104. Meinhart A, Alonso JC, Strater N, Saenger W. 2003. Crystal structure of the plasmid maintenance system *epsilon/zeta*: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by *epsilon2zeta2* complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:1661–1666.
 105. Moreno-Córdoba I, et al. 2012. The toxin-antitoxin proteins RelBE2*Spn* of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and association to their DNA target. *Proteins* 80:1834–1846.
 106. Moscoso M, Domenech M, García E. 2010. Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* 77:1052–1064.
 107. Motiejunaite R, Armalyte J, Markuckas A, Suziedeliene E. 2007. *Escherichia coli* *dinJ-yafQ* genes act as a toxin-antitoxin module. *FEMS Microbiol. Lett.* 268:112–119.
 108. Moyed HS, Bertrand KP. 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* 155:768–775.
 109. Mrazek J, Gaynon LH, Karlin S. 2002. Frequent oligonucleotide motifs in genomes of three streptococci. *Nucleic Acids Res.* 30:4216–4221.
 110. Muñoz-Gomez AJ, Santos-Sierra S, Berzal-Herranz A, Lemonnier M, Diaz-Orejas R. 2004. Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. *FEBS Lett.* 567:316–320.
 111. Murayama K, Orth P, de la Hoz AB, Alonso JC, Saenger W. 2001. Crystal structure of omega transcriptional repressor encoded by *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 314: 789–796.
 112. Musher DM. 2003. How contagious are common respiratory tract infections? *N. Engl. J. Med.* 348:1256–1266.
 113. Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A. 2011. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol.* 9:e1001033. doi: 10.1371/journal.pbio.1001033.
 114. Mutschler H, Meinhart A. 2011. ϵ/ζ systems: their role in resistance, virulence, and their potential for antibiotic development. *J. Mol. Med.* 89:1183–1194.
 115. Mutschler H, Reinstein J, Meinhart A. 2010. Assembly dynamics and stability of the pneumococcal Epsilon Zeta antitoxin toxin (PezAT) system from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 285:21797–21806.
 116. Nieto C, et al. 2007. The *yefM-yoeB* toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. *J. Bacteriol.* 189:1266–1278.
 117. Nieto C, et al. 2006. The chromosomal *relBE2* toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol. Microbiol.* 59:1280–1296.
 118. Nieto C, Sadowy E, de la Campa AG, Hryniewicz W, Espinosa M. 2010. The *relBE2Spn* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae*: role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates. *PLoS One* 5:e11289. doi:10.1371/journal.pone.0011289.
 119. Overgaard M, Borch J, Gerdes K. 2009. RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon-helix-helix motif in RelB. *J. Mol. Biol.* 394:183–196.
 120. Overgaard M, Borch J, Jørgensen MG, Gerdes K. 2008. Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* 69:841–857.
 121. Pabo CO, Sauer RT. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053–1095.
 122. Pandey DP, Gerdes K. 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33:966–976.
 123. Paul D, Pandey G, Jain RK. 2005. Suicidal genetically engineered microorganisms for bioremediation: need and perspectives. *Bioessays* 27: 563–573.
 124. Pedersen K, Christensen KS, Gerdes K. 2002. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 45:501–510.
 125. Pedersen K, et al. 2003. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112:131–140.
 126. Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. 2009. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* 5:e1000767. doi:10.1371/journal.pgen.1000767.
 127. Ramos JL, et al. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* 12:1349–1356.
 128. Rao CV, Wolf DM, Arkin AP. 2002. Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature* 420:231–237.
 129. Rimini R, et al. 2000. Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol. Microbiol.* 36:1279–1292.
 130. Rotem E, et al. 2010. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:12541–12546.
 131. Saavedra De Bast M, Mine N, Van Melderen L. 2008. Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. *J. Bacteriol.* 190:4603–4609.
 132. Saluja SK, Weiser JN. 1995. The genetic basis of colony opacity in *Streptococcus pneumoniae*: evidence for the effect of box elements on the frequency of phenotypic variation. *Mol. Microbiol.* 16:215–227.
 133. Schmidt O, et al. 2007. *prfF* and *yhaV* encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 372:894–905.
 134. Schumacher MA, et al. 2009. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323:396–401.
 135. Shah D, et al. 2006. Persisters: a distinct physiological state of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 6:53. doi:10.1186/1471-2180-6-53.
 136. Shao Y, et al. 2011. TADB: a Web-based resource for type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.* 39:D606–D611. doi:10.1093/nar/gkq908.
 137. Stocker W, Bode W. 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:383–390.
 138. Takagi H, et al. 2005. Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:327–331.
 139. Tan Q, Awano N, Inouye M. 2011. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbiol.* 79:109–118.
 140. Tashiro Y, et al. 2012. RelE-mediated dormancy is enhanced at high cell density in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194:1169–1176.
 141. Tettelin H, et al. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498–506.
 142. Thattai M, van Oudenaarden A. 2004. Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* 167:523–530.
 143. Thomas CM. 2000. The horizontal gene pool. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands.
 144. Trovatti E, Cotrim CA, Garrido SS, Barros RS, Marchetto R. 2008. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:6161–6164.
 145. Van Melderen L. 2002. Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:537–544.
 146. van Melderen L. 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.* 13:781–785.
 147. Vazquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA. 2006. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J. Bacteriol.* 188:3494–3497.
 148. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 55:1184–1189.
 149. Weihofen WA, Cicek A, Pratto F, Alonso JC, Saenger W. 2006. Structures of Omega repressors bound to direct and inverted DNA re-

- peats explain modulation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 34:1450–1458.
150. Williams JJ, Hergenrother PJ. 2012. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends Microbiol.* 20:291–298.
 151. Winther KS, Gerdes K. 2011. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:7403–7407.
 152. Wozniak RAF, Waldor MK. 2009. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet.* 5:e1000439. doi:10.1371/journal.pgen.1000439.
 153. Xu Y, Kanauchi A, von Arnim AG, Piston DW, Johnson CJ. 2003. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET): a new technique for monitoring protein-protein interactions in living cells. *Methods Enzymol.* 360:289–301.
 154. Yamaguchi Y, Inouye M. 2009. mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85:467–500.
 155. Yamaguchi Y, Inouye M. 2011. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:779–790.
 156. Yang M, Gao C, Wang Y, Zhang H, He Z-G. 2010. Characterization of the interaction and cross-regulation of three *Mycobacterium tuberculosis* RelBE modules. *PLoS One* 5:e10672. doi:10.1371/journal.pone.0010672.
 157. Zhang Y, Inouye M. 2009. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J. Biol. Chem.* 284:6627–6638.
 158. Zhang Y, Inouye M. 2011. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol. Microbiol.* 79:1418–1429.
 159. Zhang Y, Zhang J, Hoefflich KP, Ikura M, Inouye M. 2003. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 12:913–923.
 160. Zhu L, Sharp JD, Kobayashi H, Woychik NA, Inouye M. 2010. Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxins can physically and functionally interact. *J. Biol. Chem.* 285:39732–39738.
 161. Zielenkiewicz U, Ceglowski P. 2005. The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* 187:6094–6105.
 162. Zielenkiewicz U, Kowalewska M, Kaczor C, Ceglowski P. 2009. In vivo interactions between toxin-antitoxin proteins Epsilon and Zeta of streptococcal plasmid pSM19035 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 191:3677–3684.